生物化学仪器指南

第二册

色谱仪器

郭尧君 主编

科学出版社

73

58.173
428

生物化学仪器指南

第二册

色谱仪器

郭尧君 主编

中国科学院
图书馆藏
中科院植物所图书馆
S0011867

科学出版社
1989

25303

内 容 简 介

本书是《生物化学仪器指南》的第二册。介绍常用于生化分析的气相色谱仪、低压液相色谱仪、高效液相色谱仪、氨基酸分析仪、蛋白质序列仪和电泳仪。分别描述每种仪器的简单原理、结构、种类、订货须知、安装要求、验收方法、附件配置以及应用范围，还附有国内外部分厂商的仪器照片和性能介绍。可供大专院校有关专业师生、科研单位和器材部门的工作人员、进出口公司的外贸人员参考。

生物化学仪器指南

第 二 册

色 谱 仪 器

郭尧君 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1989年11月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1989年11月第一次印刷 印张：4 3/4 插页：8

印数：0001—1750 字数：95 000

ISBN 7-03-001260-7/Q·191

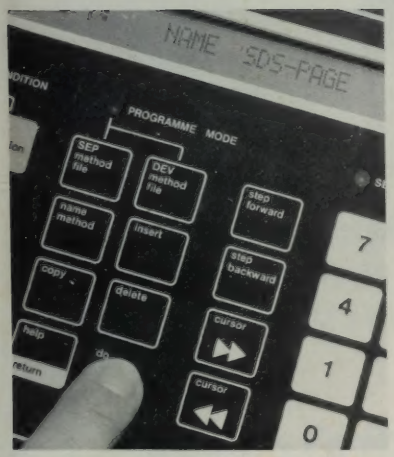
定价：6.20元

Pharmacia

LKB

PhastSystem™

全自动快速水平电泳系统



PhastSystem™是Pharmacia最新出品之全能电泳系统，亦是世界上第一部全自动控制的快速水平电泳仪及染色处理仪。配合敝公司出产的预先制备聚丙烯酰胺凝胶板（PhastGel™），可作快速分析用之等电聚焦，常规或十二烷基硫酸钠（SDS）之梯度凝胶电泳用。它能提供高速度、高分辨率及高度样品分离的重覆性等优点。此外，还有电子冷却系统，内置稳压之可调高压电源（10-2000VDC）及电压/小时积分仪，能提供稳定及有重覆性的分离条件。电泳及样品带之染色可分别同时由电脑控制。

如有任何查询，请联络下列Pharmacia-LKB办事处，我们乐意为您提供服务：

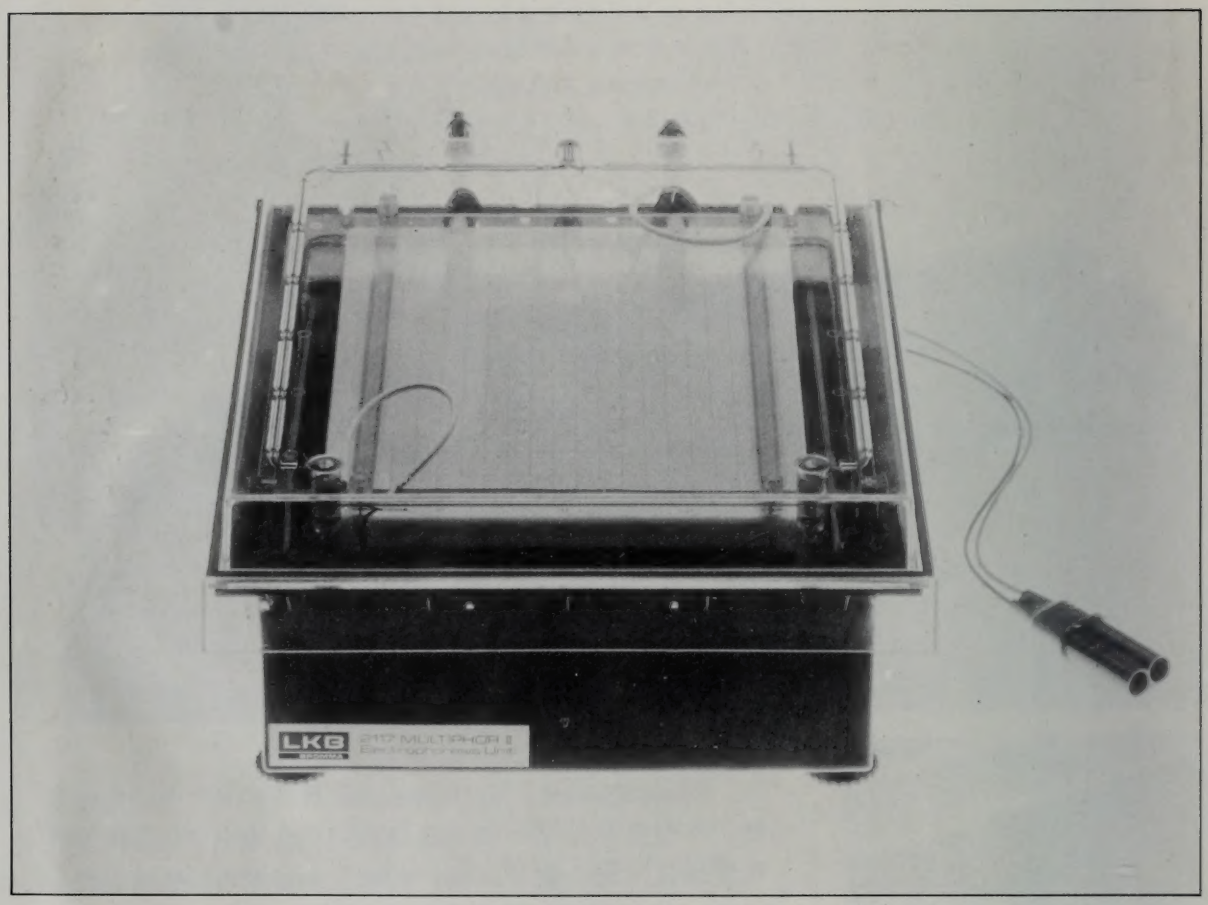
香港中国部：
香港黄竹坑道39号伟晋中心6楼
电话：5-8148421　电传：80990 PHLKB HX
电报：LKBFAREAST　图文传真：5-8734550

北京代表处：
北京海淀路138号甲北京燕山大酒店1202、1204房
瑞典Pharmacia AB北京代表处　电话：2565603
或2563388转1202或1204　电传211203YSHBJ CN
电报挂号：7415　图文传真：2565603

Pharmacia

LKB

Multiphor II
多用电泳系统



LKB Multiphor II - 2117 电泳系统是最成功并用途最广的电泳系统，其组合式的设计可为您提供多功能、高分辨率的各项技术，包括有薄层分析等电聚焦、制备等电聚焦、常规聚丙烯酰胺凝胶电泳、梯度凝胶电泳、SDS 电泳、双向电泳、琼脂糖电泳、交叉免疫、火箭电泳、免疫扩散、滴定曲线、电泳转移等…

如有任何查询，请联络下列 Pharmacia-LKB 办事处，我们乐意为您提供服务：

香港中国部：

香港黄竹坑道39号伟晋中心6楼
电话：5-8148421　电传：80990 PHLKB HX
电报：LKBFAREAST.　图文传真：5-8734550

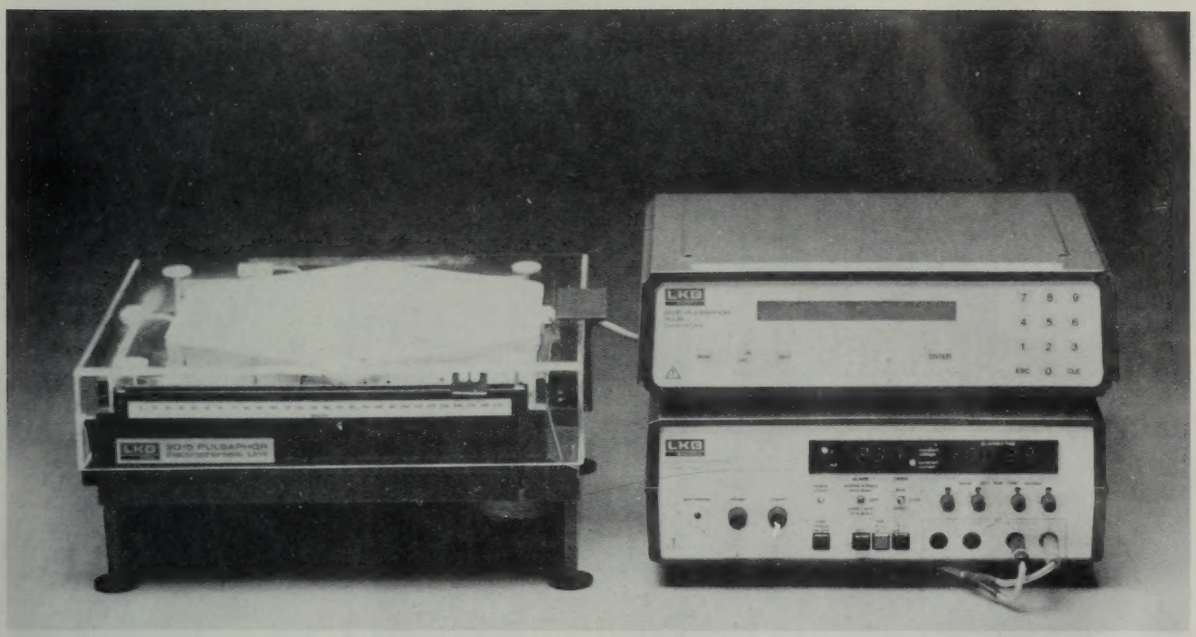
北京代表处：

北京海淀路138号甲北京燕山大酒店 1202、1204 房
瑞典 Pharmacia AB 北京代表处　电话：2565603
或 2563388 转 1202 或 1204　电传 211203 YSHBJ CN
电报挂号：7415　图文传真：2565603

Pharmacia

LKB

The Pulsaphor™ System
脉冲电泳系统



Pulsaphor™ System 解答了当今分子生物学家分离大 DNA 分子的困难，因此大大加速了基因定位和染色体图谱的研究步伐，结合了专利的脉冲电场凝胶电泳技术（PFGE）和现代微型处理机式的仪器，Pulsaphor™ System 能以高分辨力替您有效地分离大至九百万碱基对的 DNA 片段；它的基本设备可用于标准的潜水式电泳，亦提高了细的 DNA 片段的分辨力。通过世界上许多实验室的现场试验，充分证明了 Pulsaphor™ 的确是分离精良，操作方便，价格合理，更是未来生物学的桥梁。

如有任何查询，请联络下列 Pharmacia-LKB 办事处，我们乐意为您提供服务：

香港中国部：

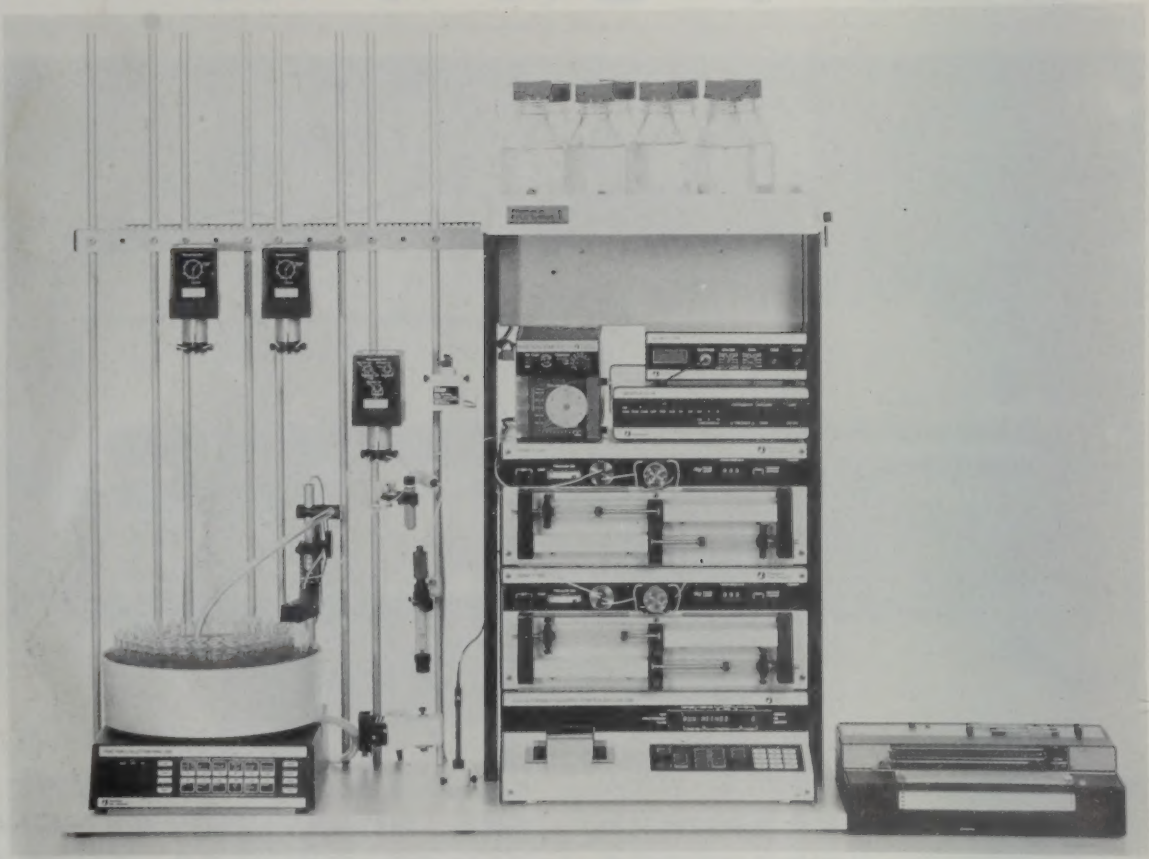
香港黄竹坑道 39 号伟晋中心 6 楼
电话：5-8148421　电传：80990 PHLKB HX
电报：LKBFAREAST　图文传真：5-8734550

北京代表处：
北京海淀路138号甲北京燕山大酒店 1202、1204 房
瑞典 Pharmacia AB 北京代表处　电话：2565603
或 2563388 转 1202 或 1204　电传 211203 YSHBJ CN
电报挂号：7415　图文传真：2565603

Pharmacia

LKB

最先进的分离技术：
快速蛋白质液相色谱系统



Pharmacia 快速蛋白质液相色谱系统（FPLC®）是专供用作快速分离蛋白质、多肽、多核苷酸及其他生物分子。整个系统包括LCC-500或GP-250微处理机控制仪，高度准确流量泵P-500，以“Monobeads™”、琼脂糖及胜胶为介质之各类预填装凝胶柱，控制阀，紫外光监测仪，pH监测仪，全自动电脑控制部分收集器（FRAC-100）及记录仪等。分离技术包括凝胶过滤、离子交换色谱、色谱聚焦、反相色谱、疏水作用及亲和色谱等。分离过程及梯度均由精密电脑控制，整个系统的生物可容性（Biocompatibility）均达到分离及提纯生物分子之严格要求。**如有任何查询，请联络下列 Pharmacia-LKB 办事处：**

香港中国部：

香港黄竹坑道39号伟晋中心6楼
电话：5-8148421　电传：80990 PHLKB HX
电报：LKBFAREAST　图文传真：5-8734550

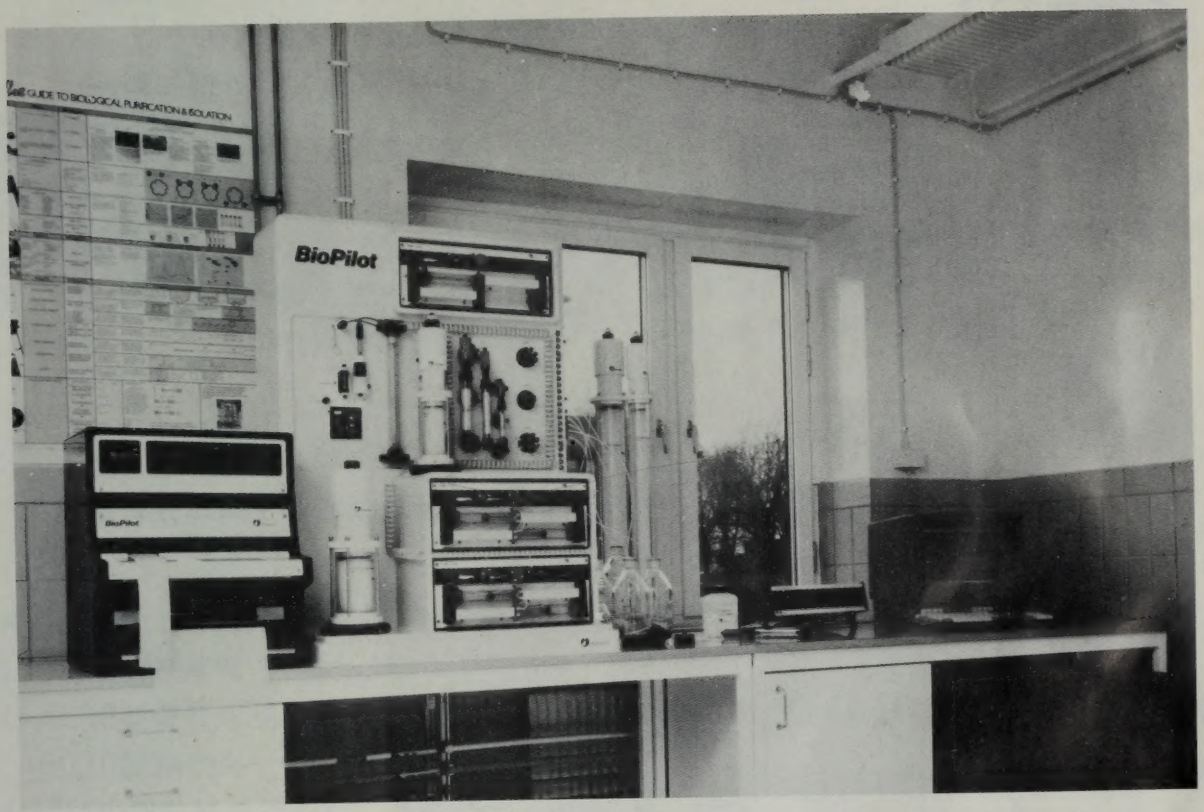
北京代表处：
北京海淀路138号甲北京燕山大酒店1202、1204房
瑞典 Pharmacia AB 北京代表处　电话：2565603
或2563388转1202或1204　电传211203YSHBJ CN
电报挂号：7415　图文传真：2565603

Pharmacia

LKB

BioPilot™

Pharmacia之最新生产规模层析系统



BioPilot与实验室规模之快速蛋白液相色谱系统（FPLC）沿用同一原理，但把它的生产能力提高十倍之多。适合配用之分离介质从10μm的Monobeads至90μm的Fast Flow凝胶。生物制品以FPLC发展分离方法之后很容易便放大到生产规模或作小量生产用于临床试验。每一BioPilot系统出厂前均经过精密之装嵌及严格之功能测验，用户可将诊断或治疗用之制成品在极短时间内推出市场。

如有任何查询，请联络下列Pharmacia-LKB办事处，我们乐意为您提供服务：

香港中国部：

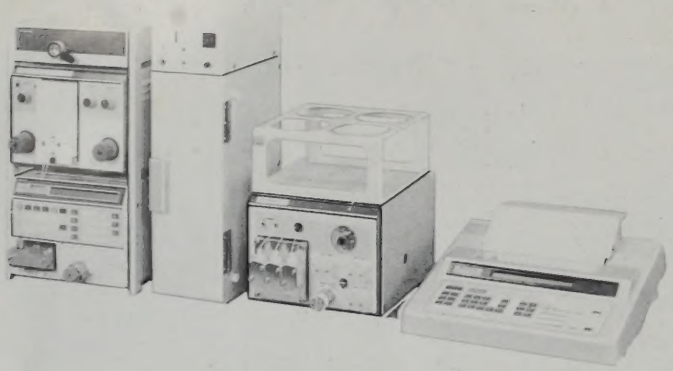
香港黄竹坑道39号伟晋中心6楼
电话：5-8148421　电传：80990 PHLKB HX
电报：LKBFAREAST　图文传真：5-8734550

北京代表处：

北京海淀路138号甲北京燕山大酒店1202、1204房
瑞典Pharmacia AB北京代表处　电话：2565603
或2563388转1202或1204　电传211203 YSHBJ CN
电报挂号：7415　图文传真：2565603

日 立 牌
HITACHI

日立高压液相色谱法氨基酸(OPA)分析系统



L-6200型智能泵
F-1050型分光荧光检测器
655A-13型反应泵
D-2500型数据处理装置

采用高灵敏的检测器和稳定性极高的泵，能对氨基酸进行高灵敏分析。

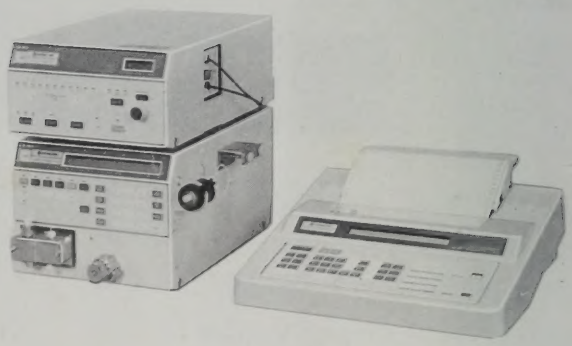
- 在荧光检测器上采用了高散射、高效率的无象差凹面衍射光栅，能进行高灵敏分析。

日立惰性高压液相色谱法蛋白分析系统

L-6210型智能惰性泵
L-4000型紫外线检测器
D-2500型数据处理装置

生物惰性流路系统能把试样的活性丧失抑制在最低限度。

- 在泵的流路系统采用着对生物化学稳定的陶瓷氟化树脂
- 采用玻璃柱，可构成完全的惰性系统。



日立分析仪器总代理：日制产业株式会社
地址：北京发展大厦14层1405号房
（北京市朝阳区东三环北路 5 号）
电话 501-4341 501-4348
传真 501-4340 邮政编码 100004

代理行：和光交易株式会社
北京 国际大厦12楼 2 号
大连 大连饭店206号
香港 华润大厦4309号
青岛 汇泉王朝大酒店400号
上海 联谊大厦1402号
广州 东方宾馆2319号
天津 利顺德大饭店办公楼20号

日 立 牌
HITACHI

日立离子色谱系统

L-6000型泵
L-3720型电导度检测器
D-2500型数据处理装置
655A-52型柱恒温箱

工作效率高且便于使用的离子色谱系统

- 因为采用着单柱法，所以能与一般的高压液相色谱仪同样使用。
- 内装有自动调零功能。

日立高压液相色谱法流动注射分析系统

K-1600型16方阀门
L-6200型智能泵
L-4200型紫外可见检测器
L-6010型惰性泵
D-2500型数据处理装置

- 分析软件丰富
- 不经浓缩就能进行ppb水平的分析
- 可将手工分析自动化
- 分析的重复性高

日立分析仪器总代理：日制产业株式会社
地址：北京发展大厦14层1405号房
（北京市朝阳区东三环北路 5 号）
电话 501-4341 501-4348
传真 501-4340 邮政编码 100004

代理行：和光交易株式会社
北京 国际大厦12楼 2 号
大连 大连饭店206号
香港 华润大厦4309号
青岛 汇泉王朝大酒店400号
上海 联谊大厦1402号
广州 东方宾馆2319号
天津 利顺德大饭店办公楼20号

日 立 牌
HITACHI

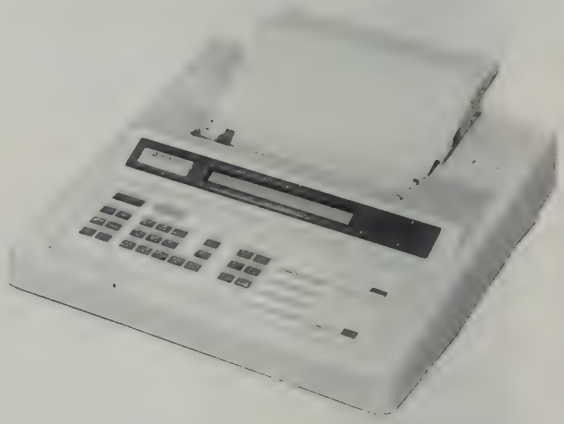
日立高压液相色谱法分取三维色谱系统

D—6000型三维色谱系统
L—6250型智能型分取泵
L—3000型多功能测光检测器
L—6050型分取泵

- 具有最适于在实验室使用的梯度流量范围(3—30ml/min)
- 与D—6000型三维色谱仪系统配套就能很容易地进行分取成分的光谱之比较。

日立D-2500型数据处理装置

- 具有高度的数据处理功能，采用着基线手动补偿、重叠记入方式。
- 采用着最多8个检测点的检测线，并将其图形化。
- 通过双方向通信使系统进一步充实。



日立G-3000型毛细管气相色谱仪

- 采用与40字双行的液晶显示画面对话的形式，易于输入分析条件。
- 使用宽敞的恒温箱，便于安装大口径柱。
- 减少须用的零件数量、能耐苛刻条件下的试验，并采用防止柱恒温箱温度急剧变化的三重防止机构，提高了可靠性。

日立分析仪器总代理：日制产业株式会社
地址：北京发展大厦14层1405号房
（北京市朝阳区东三环北路 5 号）
电话 501-4341 501-4348
传真 501-4340 邮政编码 100004

代理行：和光交易株式会社

北京	国际大厦12楼 2 号	上海	联谊大厦1402号
大连	大连饭店206号	广州	东方宾馆2319号
香港	华润大厦4309号	天津	利顺德大饭店办公楼20号
青岛	汇泉王朝大酒店400号		

PHILIPS

飞利浦

PU4400 火焰電離檢測器系統

PU4400 氣相色譜儀

PU4400 是新式氣相色譜儀，最適宜於毛細管色譜術，不過，它也有很好的塡充柱性能。

標準系列或其它特別的譜儀能作許多種類的氣體分析。如有必要，還可隨時改進，並不麻煩。色譜儀的操作簡單。薄膜鍵是容易明白和使用的，大部份數值都是用單次鍵擊輸入。清楚地顯示全部狀態訊息和幫助訊息。

毛細管柱的操作已在 PU4400 中予以最優化，只要認眞注意儀器的具體化規定即可辦到。關於塡充柱的性能也是如此。

兩種新式注射器爲多數毛細管工作模式提供分裂／無分裂和程序化的熱蒸發性能。後備注射器有 530 個微型柱和塡充柱注射器。五種檢測器全都適用於毛細管柱和塡充柱，性能優眞。五種通用軟件包包括了大部份應用，如果加上若干附件和適當地改動，它們還可擴大到更多的複雜應用。若有些應用沒包括在軟件包中，則可訂購些別的程序，使儀器的結構能精確地適應分析需要。由此可見，這是一種理想的儀器，能作各種類型的分析，以日常工作到科學研究，樣樣皆可。

擴大 PU4400 的應用或插入新的毛細管都相當簡單，只要配備附加的注射器和檢測器通道便可。能同時裝兩個色譜道。還能方便地裝上自動化單元，如自動注射和數據處理，以及增加各種分析附件。

PU4400 的性能穩定。微處理器既可連續檢查它本身的性能，也能檢查儀器的性能。這能確保儀器的高水平操作和優異性能。

自動注射

利用自動化注射能夠降低分析成本和提高分析質量。

把試樣裝進位於傳送帶上的瓶子，然後自動注射。分析完成之後，立刻注入下一個試樣。這樣，晚上也能工作，而且無需監視。

注射的頻率大於人員所爲，這是因爲每次注射的時間都是精確固定的，它的重現性比手工注射起碼好五倍。

所有飛利浦生產的氣相色譜儀都能自動化注射，它是實驗室自動化的重要組成部份。

PU4810 和 PU4811 積分器

PU4810 和 PU4811 備有靈活而易用的數據處理器，如有必要，還可改進。

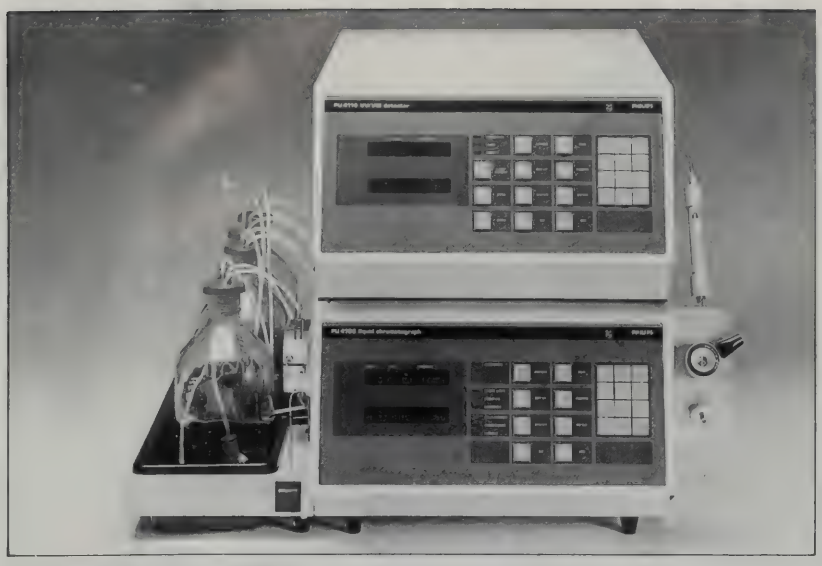
PU4811 是單道積分器，價錢便宜。

PU4810 還可以配備 BASIC，供用戶編程序。

還有些標準插件供選購：附加積分道、外部事件控制單元和 RS232C 通訊系統。

PHILIPS

飞利浦



PU4100 組合式液相色譜儀

飛利浦生產的這類儀器能滿足全部液相色譜術的需要。它能全是組合式的，包括等濃度式、梯度式和發展所需的各種方法。而且採用了最新的液相色譜技術：微孔技術和快速技術。同時，改進了傳統的液相色譜性能。微孔技術減少了溶液的用量和改善了靈敏度。快速技術縮短了質量控制實驗室的分析時間。

技術

液相色譜是與氣相色譜相似的分離技術，差別在於用液體溶劑洗脫試樣。有兩種基本的洗脫方法：等濃度色譜和梯度洗脫色譜。前者用固定成份的溶劑分離試樣的組份；後者把兩種或多種溶劑按線性或指數性梯度混合起來，以便分離更複雜的混合物。

應用

對各種基質試樣的成份進行定量和定性分析，分析靈敏度達到 ppb。這是一種很有價值的分析技術，可應用在醫藥、生物流體、食品、飲料、聚合物和離子種類的分析。

PU4100M 液相色譜儀

PU4100M 是專門爲現代實驗室而設計的，它是理想的液相色譜儀，既精美，重現性也好。該系統採用了最新的微孔技術和快速液相色譜技術，而且，改進了傳統色譜柱的性能。

優點

▶可靠的雙活塞泵能穩定而精確地輸送溶劑。

▶低分散設計，把柱外峯的分散性減至最小，以確保極好的色譜性能。即使採用微孔和快速液相色譜柱也毫不遜色。

▶易讀的顯示方式可連讀指示系統的參數，檢測器波長或吸收值。

▶流量範圍寬，溶劑輸送準確和重現性好，其範圍從每分 10 μ ml 到每分 5.0ml。

▶注射器的注入閥可選，能精確地注入試樣，範圍從 0.2 μ ml 到 2ml。

▶靈敏的可變波長紫外檢測器。波長範圍寬且性能可靠，靈敏度高。

▶有多種流動池供選擇，爲微孔分析、製樣和快速液相色譜分析選擇最佳條件。

▶每個檢測器裏的炫耀式全息光柵將散射光減至最少，而且提高了響應線性。

▶注重可靠性和使用方便，確保儀器每天均能提供高度可靠的分析結果。

功能無雙的 PU6003 二極管陣列式系統

PU6003 二極管陣列系統是新式解題工具，尤其適用於科學研究、開發研究和方法研究實驗室。

它能連接高性能的 PU4021 多道檢測器，提供遙控或本機控制，或者與新型 PU4120 二極管陣列檢測器連接使用。

PU6003 系統採用 Chromascan II 軟件。這是一種非常有效的軟件包，它能標明雜峯、鑑別未知成份、甚至編造參考圖譜庫。

該軟件可在 IBM 環境中操作，而且在多任務窗口條件下運行，以比較容易地找到某一問題的癥結所在。

關於峯的純度問題，軟件能指出確定純度的試驗範圍，因而也就確定所用液相色譜法的可靠程度。

一整套數據處理規則使查明那怕是最困難的問題也成爲可能。

儘管數據浩繁，用戶始終是通過存儲、檢索和編錄所有資料、方法和變換而使自己處在指揮地位。記錄和報出的各種錯誤提醒分析人員將出現什麼問題。

軟件使用彩色和高分辨率圖象，這對處理重疊的光譜是大有帮助的。

在 PU6003 中，二極管陣列數據收集和顯示與强有力的綜合性軟件包合爲一體，爲解決定量分析的問題提供了方便。該系統還能通過加進 PU6030 數據收集裝置而使功能得以延伸，收集和整理從任何色譜儀上得到的資料。

可見，這是目前最好的數據處理系統，完全能滿足當今繁忙的分析實驗室的需要。

選購件

飛利浦的液相色譜儀系列中尚有下列附件供選購：

▶ PU4025 可變波長紫外檢測器，帶有火焰式全息光柵。

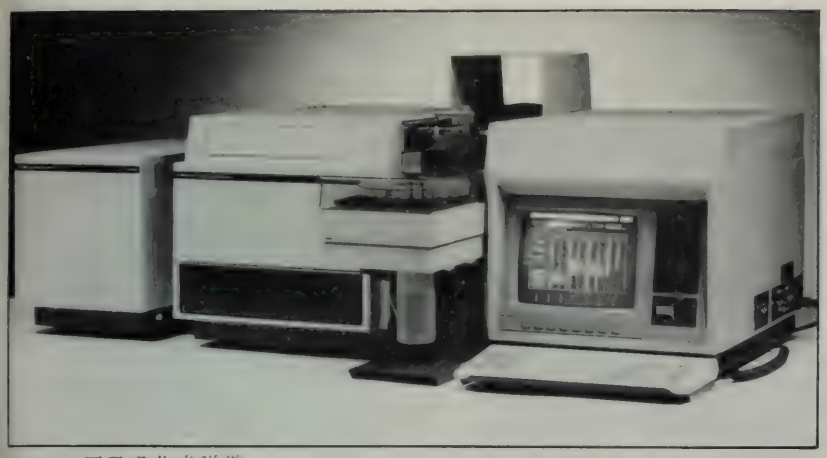
▶ PU4022 電化學檢測器，能分析複雜試樣（如人體中的流體）中的痕量成份，靈敏度和選擇性均好。

▶ PU4026 折射率檢測器，這是新型多用途檢測裝置，高度穩定且非常靈敏。

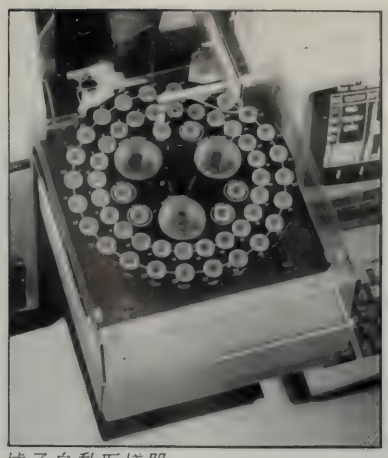
這些裝置的性能良好，使用方便，因此可以檢測碳水化合物、羧酸和非紫外吸收的聚合物。

PHILIPS

飞利浦



PU9400原子吸收光譜儀



爐子自動取樣器

PU9400自動多元素光譜儀

對於繁忙的實驗室或研究所，若需要較好的原子吸收光譜儀，則PU9400光譜儀正合適。該系統標誌着光譜儀發展到一個新階段。它能順序地分析16個元素。通過單用戶接口操作譜儀。有三個操作模式：火焰、爐子和蒸汽，可任選其中之一。其次，它的先進技術能保証最好的濺射條件，使儀器的性能最佳。

優點

▶若使用數碼式空心陰極燈，光譜源識別技術使儀器能自動地探測元素和調節電流達最大。

▶革命性的斯托克達光學系統帶來雙光束的優越性，但不損失訊噪比。

▶原子吸收光譜儀才有的全息光柵（非複製品），狹縫是專利設計。

▶氟塑料濺射室最適合於火焰。燃燒室有很强的處理能力。有除PPS的夾子、自動灌注系統和氣體安全控制系統。還有惰性氣體霧化器（標準件）。

▶內裝大型彩色視頻顯示單元，圖象清晰。雙面64K字節的軟盤可存儲方法、圖象和結果。

▶根據試樣基體元素的訊號，系統選擇和優化條件。如有必要，還選擇波長。自動調節火焰條件，以便得到最優的訊號。選擇的參數還有：燈座、閱讀時間、帶通和火焰類型

▶利用具有不同比值的5個標樣進行校正和重校正。利用最好的標樣自動重定標。飛行物和第一峯自動排除方式適於爐操作

▶對於2A快變背景，束剖面背景修正的誤差優於2%。

▶內裝火焰自動取樣器（選購），利用單鍵盤控制自動化火，系統。

▶擊一下鍵，系統就會轉到强大的用戶編輯計算機，允許操作者寫下他們自已的用作進一步數據處理的或其它任務的程序。靈活的外部計算機接口通過雙路RS232C和多功能打印機而輸出訊號。

▶新式先進的多元素爐子系統配備有整套試樣製備裝置和顯示單元，以及有關控制裝置的基本元件，包括獨特的爐子自動探針。

▶完全可以連接到連續蒸汽流系統（該系統是通過單機用戶接口而被控制的）。獨特的槽管式原子捕集技術有助於彌補火焰／爐子靈敏度的不足。

PU9200/PU9400的附件

PU9390爐子

該爐子能迅速地與燃燒系統交換，但不中斷與氣路的聯繫。這是因爲採用了管道補償系統，使爐子能立刻連到譜儀。爐頭提供金石墨惰性容器環境和高壓徑向連接，確保各種容器有良好的電接觸。這些容器有先進的熱解石墨池(TPC)。

每個內部池的氣流都是可以改變的，其中有兩個可以換上別的氣體，如空氣或氬氣和乙醚的混合物。不論在爐周期的20個相中的哪一個，這些條件都可以被編進程序。這樣，複雜混合物的灰化過程能順利地進行

光學溫度反饋系統提供快速響應，確保盡可能高的加熱速率。獨特的纖維狀光學輻射轉換系統提供無干擾的測量和顯示池溫度。

如果採用PU9380爐子自動取樣器，試樣注射溫度可調至200℃。這有利於分析大試樣和使用有機溶劑。

由於採用高效的內部冷却系統，使到高溫爐操作周期在兩秒內便能完全冷却下來。

PU9380爐自動取樣器

若爐頭是爐式原子吸收光譜儀特性的關鍵，那麼，爐自動取樣器便是自動化的關鍵。PU9380不僅是取樣裝置，而且是提供全部所需的製樣裝置。

自動化製樣和成形是爐子設計的焦點，關係到測量的準度和精度，而且，它還能執行複雜的試樣分析而不必看管。

下列各項結合起來就能使分析更加完善：

▶按照固定體積或任意體積製備標樣

▶標樣摻合製備

▶標樣所有其它形式

▶試樣的稀釋和濃縮

▶濕或乾拌物料的定量

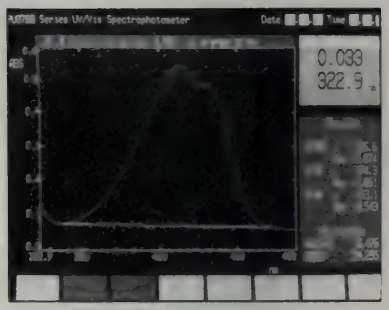
▶全重新標定（重量）

自動取樣器運行說明書，自注便查表和“烹調手册”使操作極爲容易。使用清洗技術（專利）使交叉污染減至可以忽略，而且，片刻就能改變取樣量

PHILIPS

飞利浦

PU8700紫外／可見光分光光度計



PU8700系列紫外／可見光分光光度計

PU8700系列是新式、快速、高性能而價錢不高的紫外／可見光掃描分光光度計。其特點是速度快，操作容易。通過一台可自由放置的和具有高分辨率彩色或單色視頻顯示裝置VDU即可看到全部儀器控制功能和分析數據。在同類儀器中首次採用了一種鼠標器驅動的用戶接口以接受下列程序：參數選譯，數據顯示、變換、存入、調出和常規運算。

採用垂直上托程序清單和水平軟鍵選擇參數。全部人機對話可得到下述幫助：聲音和彩色標記提示，錯誤警告和擴展的自動化幫助訊號。

依靠兩個微處理機，利用分類處理概念使PU8700系列的電子單元和光學系統實現控制和最佳化。

以68000爲基礎的實時多功能操作系統協調用戶接口、圖象和應用程序，而較低級的光學和機械操作則使用Z80系統。

主機總共包含448K ROM和 124K RAM。用選購件和內插式RAM擴展件還能擴大應用範圍和數據庫。

PU8700系列不僅提供高性能的軟件和無誤的操作，而且還有其它非常突出的性能。用快速和高效的光學通道可以獲得非常好的精度和重現性而不必顧及掃描速度的影響。

高效率的R446光電倍增管具有獨特的溫度補償功能，它能提供良好的穩定性和基線平整度。精良的全息光柵具有良好的分析線性，而精緻、高質量和鍍石英的光學設計意味着低噪聲、高穩定性和低成本。

優點

▶掃描範圍從190-900nm，用高分辨率螢屏顯示數據，30秒內列出帶標誌的峯位。

▶色譜分析程序包括線性和非線性校正模式。用圖和表來表示結果，其中的單位和分析限由用戶自定。

▶時基或酶分析用的牽軟件把數據和過程曲線顯示在屏幕上。

▶全部應用軟件均採用實時和後行數據操作方式，其中包括跟踪、平滑處理、連續變倍、比較、模式變更、重新定標和計算。

▶應用可隨意放置的快速打印機按照實時和後行方式輸出結果，並列出已標識的譜和所用方法。

▶數據庫利用電池供電的RAM存儲數據、方法和校正曲線。QWERTY能命名庫中的內容，給出試樣的標記指令，並把提示和其它信息保留在記憶區裏。

▶大的橫置試樣室裝有多用途池架，可安放任意程長和規格的矩形池或柱形池，也能裝固體試樣。

▶備有大量附件和軟件，包括多波長、多成份分析、先進的動力學和溫度程序設計。

顯然，PU8700系列對每個實驗室都是很實惠的。

PHILIPS

飛利浦

PU9800 傅利葉變換紅外光譜儀系統

Spectra-Tech 紅外平面顯微鏡

PU9800 傅利葉變換紅外光譜儀

這是新式的傅利葉變換紅外光譜儀，它是建立在著名的反射鏡運動的設計原理上的，有優良的性能和靈活性。由於功能超羣，故價錢不應當成爲問題。

當遇到難處理的試樣時，傅利葉變換紅外光譜儀即顯示出它的長處。就是說，少量試樣就能進行分析，尤其是通過迅速地將光譜累加而使信噪比得到改善。

對有多種應用的實驗室而言，PU9800 系列的確是十分理想的。

EAGLE（Easy 插口和 Global 線插口）軟件對不經常使用儀器和有經驗的用戶來說都是極佳的。Easy 插口通過程序單來提供，而 Global 線插口則提高了分析速度和靈活性。

優點

▶可靠的和高性能的反射鏡運動提供了良好的重現性和可靠性。

▶ IBM AT 兼容數據站能運行多種專門軟件包。

▶ EAGLE 軟件提供全譜的加工，包括自動扣除以及往計算機硬盤存入資料。

▶高級的庫檢索軟件（選購件）能檢索庫存資料。

▶多標準定量軟件（選購件）能把結果存入磁盤或在打印機上輸出。

▶能存入全部分析方法，包括操作提示和單鍵功能。

▶能產生紅外顯微鏡用的外部光束，以處理微小試樣。

光學顯微鏡

近年來之最新技術成就無疑是傅利葉變換紅外光譜分析用的光學顯微鏡。利用這種顯微鏡使操作者能清楚地看到分析試樣的正確位置，並通過縮小光孔以選擇分析點。然後紅外光束通過光學系統，並用透光或反光方法獲取紅外譜。

用 35mm 相機能同時拍下樣品的光譜和圖象，爲法學提供可靠的證據。

顯微鏡本身在主機之外，而且有它自己的 MCT（汞鎘的碲化物）檢測器。樣品室留作較較標準的樣品分析之用。

飛利浦香港有限公司
香港堅尼地道 17 號
合和中心 26 – 29 樓
電話：8215888
電傳：43752 PHILH HX
圖文傳眞：8655408
電報：PHILHONG

飛利浦中國有限公司
中國北京建國門外大街 22 號
賽特大厦 22 樓
電話：5128883
電傳：22850 PHILI CN
圖文傳眞：5127351
電報：PHILICHIN

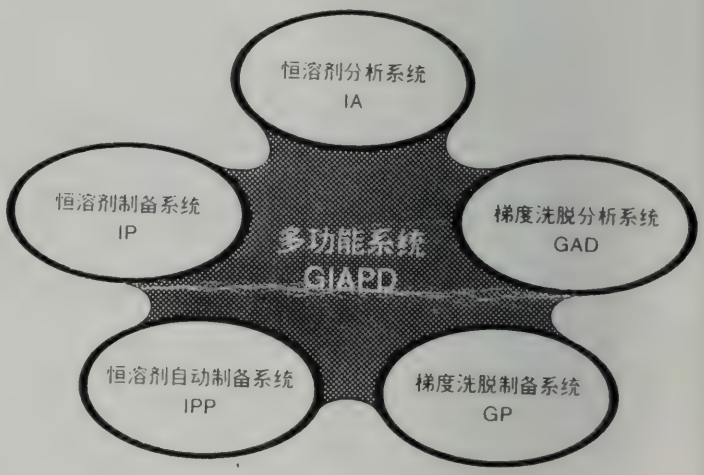
中國上海市延安東路 100 號
聯誼大厦 17 樓 1701 室
電話：3264140-2
電傳：33427 PHSHA CN
圖文傳眞：3202160
電報：PHILISHA

GILSON

吉尔森高效液相色谱仪
多功能系统GIAPD

集五种用途于一身的吉尔森多功能系统(GIAPD),配有最新 714 软件。除进行各种高效液相色谱分析外，还可在实验室条件下制备克级以上纯化合物或标样，一机多用。全自动化控制，灵敏、可靠。

- 305高压柱塞泵。泵头可替换，流速范围自微量分析级至制备级，无压力脉动。兼备洗脱泵及自动进样泵功能。
- 116 程序控制紫外检测器。操作模式有单波长、双波长、扫描、自诊可编程序检测。
- 203馏分收集器。十种收集模式，十个程控时间窗。120个收集馏分
- 714系统控制软件。即时屏幕显示，色谱图局部放大及再分析。四元梯度控制。四组检测信号同时积分处理。色谱分析报告自动存储。鼠控器操作



吉尔森公司中国及港澳总代理：华运有限公司

地址：香港上环永乐街172－176号永富商业大厦三楼
电话：5430760　电传：61213 WOWAY HX　传真：(852) 5414330

GILSON

兼备净化及富集功能

吉尔森自动样品处理装置

如果您正繁忙地进行样品预处理，或者正为分析结果重现性差和回收率低而束手无策，那么现在可以松一口气了。……

ASPEC 自动试样萃取仪

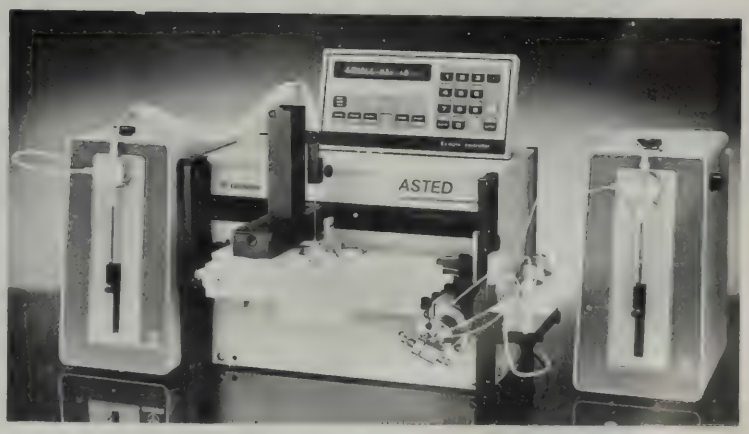
ASPEC是一套在DEC柱上进行液固萃取的全自动装置，用于液相色谱、气相色谱、光谱、放免测定等样品的净化和富集

- 一次处理108个样品，重现性佳，回收率达98%
- 各种标准DEC柱通用，有二十余种固定相
- 程序控制柱老化、加样、清洗、洗脱等步骤，二十四小时连续工作
- 净化了的样品自动注入HPLC仪联机分析
- 可编程序对样品稀释、分样、混合、柱前预反应、添加标样等

ASTED自动痕样渗析富集仪

ASTED巧妙结合了渗析净化和柱富集两种功能，从复杂样品中分离出低分子待测物，应用于各种生物样品的预处理。

- 一次处理64个样品
- 15 kD 渗析膜有效除去大分子及固体杂质
- 渗析液经TEC柱富集后自动注入HPLC仪联机分析
- 工作完毕自动清洗渗析池及TEC柱，可连续使用1000次以上。
- 内存分析氨基酸及药物的五个文件，方便使用

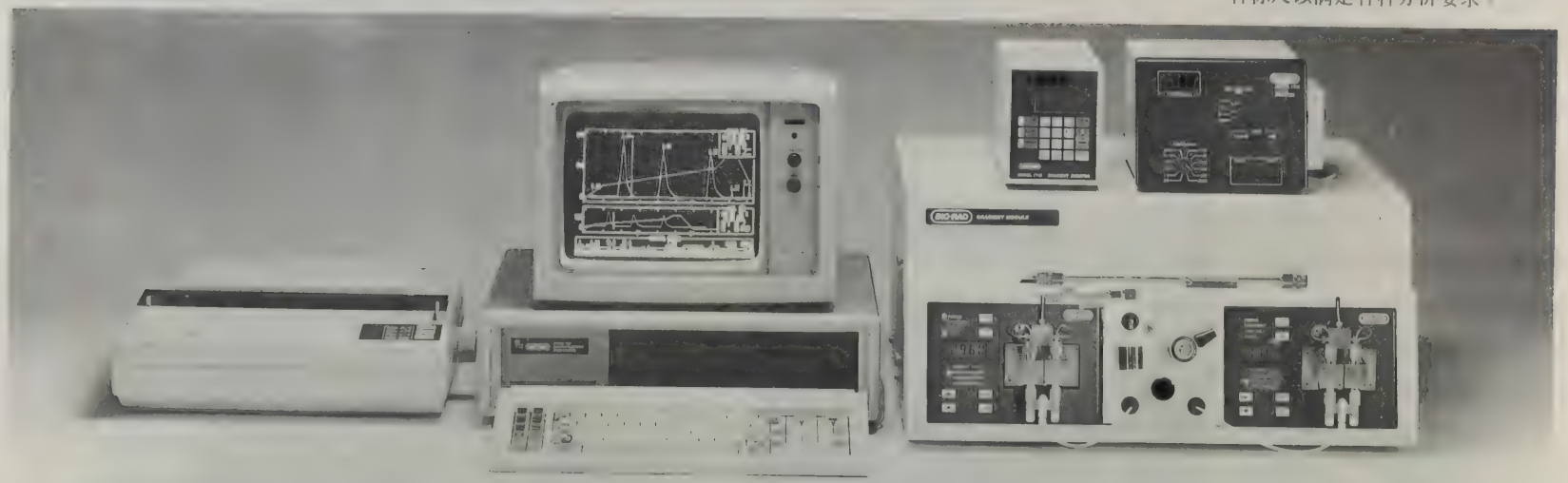


吉尔森公司中国及港澳总代理：华运有限公司

地址：香港上环永乐街172－176号永富商业大厦三楼
电话：5430760　电传：61213 WOWAY HX　传真：(852) 5414330

HRLC 注册商标 新一代的高效液相色谱：

- ▶ 新1350型，自动启动逐步升压输液泵系统，可延长柱子寿命
- ▶ 供生物相容性之钛质结构
- ▶ 选用不是单一理化特性的柱子能保证取得最佳的分离效果
- ▶ 二元或三元高压梯度溶液系统可达到精确重演的分离效果
- ▶ 微伏灵敏，可清晰显示多到6个通道的数据曲线尽象显示屏
- ▶ 定制的常液系统，可用最适合的检测器。
- ▶ 彩色打印机，能提供您完整的工作报告和色谱画。
- ▶ 可任意选择PCXT 或AT 电脑与IBM 电脑兼容。
- ▶ 预先组装和经过预试验组合系统给用户带来方便和灵活性
- ▶ 可同时监控3个独立系统这单一键盘上能控制泵、注射器，进样器等组件之号数变化。
- ▶ 多点计算方法：
  可用线型或非线型回归计算的多种标尺以满足各种分析要求。



BIO-RAD

伯樂太平洋公司

台北市輔道西1號先施保險西環大廈12樓　市話Tel：5-470333, 5-470616

市傳Telex：89085 BRPHK HX　圖文傳真FAX：8681464

It's the Chemistry that Counts.™

序　言

自1982年《生物化学实验技术》丛书问世以来，深受同行的欢迎。但是这套丛书在描述各种生化实验技术时，由于篇幅所限，对通常使用的各类仪器只作粗浅的介绍。为了弥补这方面的不足，使生化工作者在从事实验研究时，更好地了解和操作这些仪器，我们决定试编这套《生物化学仪器指南》书，作为前套丛书的姊妹篇。

近代生物学的长足进步，主要是与测度和观察以及制备技术的进步平行发展着的。而这一方面的进步又是和仪器与仪器的构筑（instrument and instrumentation）分不开的。人们常常说科学已进入生物学的世纪，这正是由于上述两种进步促成的。在生物学发展过程中进步表现在两个方面：即一些新概念的提出，及一些存在的观念在实验上的体现。只要想一想50至60年代里Watson和Crick的关于核酸分子的双螺旋模型的提出及DNA分子的半保留复制方式的证明和X射线衍射及超离心实验技术的关系就可以明白技术的进步是怎样地推动了本世纪下半叶的生物学的进步。

我国目前在实验室工作中困难很大的一部分来自生物学工作者常常不熟悉仪器，而许多技术工作者又常常不了解生物学工作者的思路。其结果是常常产生一些方法学的错误与解释上的讹谬，甚至在实验技术上无从着手。解决这种困难的办法一方面应该是加强不同训练背景之间的人员合作，另一方面则应使两种工作人员在知识上及训练上做一定程度的相互渗透。渗透可以保证两种工作人员产生共同语言以进行概念及实验上的交换。我们的这套书正是朝着这一方向努力，希望它既有益于"纯粹的"生物学工作者，也有助于"纯粹的"技术工作者。

近来，我国大量进口与引进了国外的先进实验仪器以作为实验中的工作手段。但是只要到一些科研与教学单位去看一下，便知道这些仪器的使用常常远非是合理的，有的"大才小用"，有的搁置不用，有的则物非其用，其结果是外汇已经用了，实验室空间也占满了，但未能明显地推动研究工作。

仪器随着其自动化程度、精度以及用途的多样性，其价格差别也很大。对于一个购置仪器的人来说，首先要明白自己需要什么，能付的预算款有多少。对于仪器说来绝非按钮愈多愈好，它和使用者的目的是互为表里的。仪器的最佳选择应该是对研究工作者的工作完成有所裨益。

这套书介绍了仪器的原理、使用及其应用范围。在我们的书中登了一些厂家产品介绍，主要是作为例证式的介绍，当然它们不一定是唯一的选择。在仪器的选择中技术以外的因素，例如价格、伺服的简便性、实验人员使用仪器的频度也常常是选型所必不可少的考虑因素。

这套书定名为《生物化学仪器指南》，但考虑其内涵则并不局限于生化仪器，或者说它涉及的是在近代生物学中与生化方法一同使用着的仪器。全书分四册，依仪器使用者的宽度（popularity），而定其先后次序予以介绍。读者可以由本书目录中看到被介绍的仪器中有的在发展阶段上已较成熟，但有的尚在其襁褓阶段。总的说来，成熟的仪器易于使

用，但难于得到新颖的结果；研制中的仪器使用者的技巧要高、投资风险要大，但开拓的可能也大些，这一些细心的读者当能心领神会。

这套书初步分为《光谱仪器》，《色谱仪器》，《波谱仪器、离心机、X 射线衍射仪等》及《显微镜、电子显微镜及其附属设备》四册，它既可以分册使用，又互相配合，成为一个有机整体。近代的信息爆炸（information explosion）造成出版泛滥，有的书卷帙浩繁，不胜阅读之苦。我们的书以图释文，以电报式的语句，言简意赅地说明问题。我们力求使读者获得有用信息的同时能在金钱、时间及判断的花费上付出最低值。我们希望这些目的能够达到，并欢迎广大读者指正。

徐　浩

前　　言

继第一册光谱仪器之后，本分册主要介绍色谱仪器。作为一种制备和定性、定量分析的有效工具——色谱仪器已被广泛应用在各个领域中。它主要是利用生物大分子本身的带电性质、分子大小等特性，在充满分离介质的层析柱中或凝胶介质中进行分离，从而达到制备或分析的目的。层析方面的仪器有制备用的层析仪以及主要用于分析的高效液相色谱仪和气相色谱仪，还有氨基酸分析仪及序列仪。电泳方面的仪器有用于蛋白质和核酸分析的各种水平和垂直电泳仪。本分册对这些色谱仪器的简单原理、仪器结构、种类、安装要求、性能检查、附件及简单的应用作一概略介绍，并附录一些仪器的性能。希望既能从中找到你需用的仪器，又节省经费、外汇，从而保证实验的需要。如果我们作者有限的知识和经验能为读者提供有价值的信息，这就是我们的心愿。

郭尧君

目　　录

序言……（i）
前言……（iii）
第一章　气相色谱仪……赵成华（1）
一、引言……（1）
二、气相色谱仪……（1）
（一）进样系统……（2）
（二）气相色谱柱……（3）
（三）检测器……（4）
三、气相色谱的分离原理和分离条件选择……（5）
四、定性分析……（8）
五、定量分析……（8）
六、制备气相色谱……（9）
七、气相色谱仪在生物学中的应用……（10）
八、某些国内外气相色谱仪简介……（12）
九、气相色谱仪附件的选择和安装条件……（13）
第二章　低压液相色谱仪……贺宝珍（14）
一、凝胶色谱法……（14）
（一）原理……（14）
（二）凝胶的类型、性质及厂商……（14）
（三）凝胶层析的应用……（17）
（四）凝胶过滤的实验操作……（17）
二、离子交换柱层析……（19）
（一）原理……（19）
（二）离子交换树脂的选择及操作……（19）
（三）应用……（21）
三、亲和层析……（21）
四、低压柱层析装置……（22）
第三章　高效液相色谱仪……谢光华（23）
一、原理……（23）
二、仪器……（24）
（一）高压输液泵……（25）
（二）进样阀……（25）
（三）色谱柱……（26）
（四）检测器……（26）
（五）记录器（或积分仪）……（32）

（六）梯度洗脱装置……（32）
（七）分部收集器……（32）
三、选购知识……（33）
四、验收知识……（34）
（一）高压输液泵……（36）
（二）检测器……（36）
（三）进样阀……（38）
（四）色谱柱……（39）
（五）记录仪……（39）
（六）梯度洗脱装置……（39）
五、在生化中的应用……（40）
第四章　氨基酸分析仪……贺宝珍（41）
一、原理……（41）
二、氨基酸分析仪器……（42）
（一）氨基酸分析仪的结构……（43）
（二）不同型号仪器的性能……（44）
（三）氨基酸分析仪进展……（45）
（四）氨基酸分析仪的应用……（46）
三、氨基酸分析仪器技术……（46）
（一）仪器安装及验收……（46）
（二）仪器的维护和保养……（47）
（三）氨基酸分析仪验收指标……（47）
第五章　蛋白质序列仪……杨　端（48）
一、前言……（48）
二、简单原理……（48）
（一）偶联……（48）
（二）断裂……（49）
（三）转化……（49）
三、仪器种类及简单结构……（51）
（一）液相(旋转杯)蛋白质／多肽序列仪……（51）
（二）固相蛋白质／多肽序列仪……（52）
（三）气相蛋白质序列仪……（53）
（四）脉冲式液相蛋白质／多肽序列仪……（53）
四、实验室要求及所需附件……（55）
（一）实验室要求……（55）
（二）附件要求……（55）
（三）试剂要求……（55）
五、对蛋白质样品的要求……（56）
第六章　电泳仪……郭尧君（57）
一、电泳技术的历史……（57）
二、电泳分离的原理……（57）

三、各种电泳仪器与用途……（58）
（一）垂直管型分析盘状电泳仪……（58）
（二）垂直板状电泳仪……（59）
（三）水平平板电泳仪……（59）
（四）用于核酸分析的电泳仪器……（60）
（五）电泳转移仪……（61）
（六）制备电泳仪……（62）
四、电泳仪器的配套装备……（62）
（一）电源……（62）
（二）循环恒温水浴……（63）
（三）凝胶干燥器……（63）
（四）透照仪……（63）
（五）电泳浓缩器……（63）
（六）光密度扫描仪……（64）
五、应用……（64）

第一章 气相色谱仪

赵 成 华

一、引 言

气相色谱法是色谱法的一种。它是以气体(氮、氦或氢)作为流动相，以固体(气-固色谱)或液体(气-液色谱)作固定相，对混合物进行分离的，并在分离的基础上对物质进行定性、定量分析。气-固色谱常用活性炭、硅胶和分子筛作固定相。它是按吸附色谱原理进行工作的。它主要被用来分析永久性气体及低分子量烃类。由于它在生物学方面应用不多，这里不加详述。气-液色谱是按分配色谱原理工作的。自从 James 与 Martin 1952 年发明这种方法以来，它已被不断地加以完善。由于它的高效分离能力(例如毛细管色谱柱可分离出一百多个组分)、高选择性(可分离性质极近似的物质如顺、反异构体，旋光异构体等)、高灵敏度(某些检测器可分析 10^{-11} 克物质)及快速分析(一般只需数分或几十分钟即可)，至今已在许多生产、研究部门得到了广泛的应用。在生物学上它可以分析生物体内许多重要物质如：酯类、糖类、氨基酸、固醇类、维生素等。在研究药物、毒物对生物体作用方面，它也是一种重要方法。近年来昆虫激素、昆虫信息素等生理活性物质研究得以飞速发展，气相色谱法起了关键的作用。

气相色谱法中使用的仪器叫气相色谱仪。美国于 1955 年、日本于 1957 年已开始出售气相色谱仪。随着色谱柱和检测器的发展，70 年代这种仪器已发展到成熟阶段。70 年代之后主要是引入许多先进的电子元件，仪器自动化程度大为提高。气相色谱仪的发展又大大地扩充了它的应用范围。因此它被称之为 20 世纪分析化学上一次最大的革命。

气相色谱仪不能直接分析在它的柱温范围内不能挥发的物质。此时往往需将它们转化成相应的衍生物，或是将大分子裂解为小分子方可分析。当然许多挥发度很低的物质也可用液相色谱分析。

二、气相色谱仪

图 1-1 是气相色谱仪流程示意图。载气由钢瓶流出，经减压阀减压，净化器净化，又经仪器中稳压阀、稳流阀之后进入气化室。用微量注射器注入的样品汽化后，即被载气带入色谱柱。样品在柱中分离后，按时间先后流入检测器。检测器能将流入的物质按其含量转为相应的电信号。电信号由放大器放大后输入记录仪，绘出一张色谱图。

气相色谱仪主要部件包括进样系统，色谱柱和检测器。

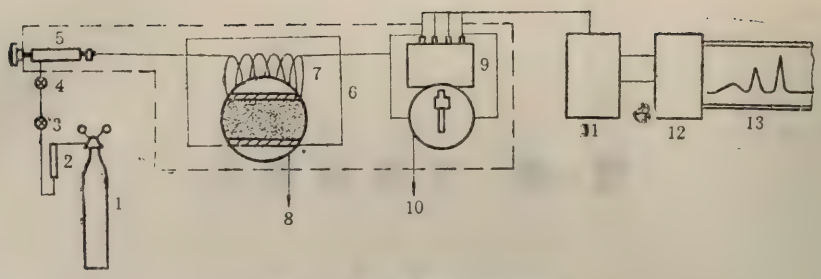


图 1-1 气相色谱仪的流程示意图

1.载气瓶；2.净化器；3.稳压阀；4.稳流阀；5.进样口；
6.柱炉；7.色谱柱；8.色谱柱切面；9.热导检测器；10.热丝切面；
11.衰减器(TCD)或放大器(FID)；12.记录仪；13.色谱图。

(一) 进样系统

可根据需要选用不同类型的进样系统 (Injection system)。一般 的进样系统由一根石英管或是硅烷化的玻璃管插入金属块构成。金属块可被电热丝加热到一定温度。它的一端接色谱柱，另一端伸出到仪器外部，由金属螺帽及硅橡胶加以密封。在汽化温度下，注入的样品可瞬间变为蒸气。

填充柱还可直接插入金属块中。此时样品即直接被注入柱头上，这叫柱上进样。现在越来越多的仪器都采用这种进样方式。它的优点是减少样品在汽化部位的扩散作用，提高柱效。

控制进样系统的温度是十分重要的。温度太低，液体试样不能全部变为蒸气，得不到对称的色谱峰。而温度过高对某些成分会引起分解或分子重排。对某些生物体中成分尤其应当注意这点。例如某些萜烯类化合物在进样口温度过高时就会分解。一般进样口温度可高于柱温 50℃ 左右。对于含易分解组分的试样，温度还可再低些。

毛细柱由于能承受的样品量十分小(通常较填充柱少 100—200 倍)，这就需要一种能对样品进行分流的毛细柱进样系统。这种进样系统在工作时先将试样蒸发为气体，在试样蒸气与载气混合均匀后由分流器按一定的分流比(例如 100：1)分流，大部试样被排到仪器之外，仅少量试样被载气带入柱中。

与分流进样系统相对应的还有一种无分流进样系统。当样品 (一般是浓度很稀的试样) 被注入进样口后立即挥发为蒸气。在一定柱温下 (一般较溶剂沸点低 10—30℃)，这些溶剂在柱头有个滞留过程，它好像一个塞子阻止了溶质的扩散，从而使溶质在柱头得以浓聚。这就是“溶剂效应”。溶剂效应避免了色谱峰的扩展。在柱内后部的溶剂会产生拖尾现象，因此在进样后一定时间 (20—60 秒) 必须打开系统中的针阀，以清扫出后部的溶剂。当然此时也会损失一点样品。最后随着程序升温，样品中各组分得以在柱中推移和分离。

最近又发展了一种毛细柱柱上进样系统。利用这个系统可将样品直接注入柱上。较之分流和无分流进样系统它具有下列优点：1)样品在较低的温度下(一般等于样品中溶剂的沸点) 注入柱上，避免了某些成分的分解。2)定量更准确。3)进样口无硅橡胶，减少了色谱系统的污染源。

无分流进样技术可使 80% 以上样品进入柱内，而柱上进样可使全部样品进入柱内。

使用这两种技术可大大降低仪器分析时的最少检知量，因此对微量分析十分有利。

最后无论是使用那种类型的进样系统，都必须周期性地用溶剂清洗其内部管道，以除去硅橡胶碎片或是残存的难挥发物。使用填充柱柱上进样时可定期更换柱头上的玻璃棉。

（二）气相色谱柱

气相色谱柱是色谱仪中最关键部分，它可被分为两种类型：填充柱和毛细柱。

1. 填充柱 填充柱是气相色谱分析中常用的柱型。虽然近年来由于熔凝石英毛细柱商品化，采用毛细柱分析的工作越来越多，但填充柱还是在气相色谱分析中占有重要位置。它的优点在于制作简单、价格便宜。另外可供使用的固定液极多，可以根据样品的构成选择合适的固定液。利用填充柱还可制备少量纯样，以供光谱分析或生物试验之用。

填充柱材料可由不锈钢、铜、聚四氟乙烯或玻璃制成。现在基本上所有型号的仪器均采用硬质玻璃制成的柱子。这是由于玻璃柱对极性样品吸附性小、易清洗。生物试样多含极性化合物如醇、醛、酸、酯、糖等，在气相色谱分析的一系列问题上必须注意这点。一般地玻璃柱在使用前需经硅烷化处理。其目的在于使玻璃表面上的羟基被硅烷化，减少活性吸附基团。其办法很简单：将一根清洗干净并干燥过的柱子注满新配制的20%二甲基二氯硅烷甲苯溶液，两端密封之。两小时后倒出硅烷化试剂，并用甲苯、甲醇依次将柱子清洗干净，最后干燥之。

柱内填充物是表面涂了一层固定液的担体。固定液含量用固定液和担体间的重量百分比表示。如称取100克担体、3克固定液，那么配出的填料固定液含量就为3%。涂渍固定液的步骤如下：先称取一定量担体和固定液，将固定液溶于溶剂中（每种固定液都有其适宜的溶剂，可查阅有关书籍或手册）。将含固定液的溶剂倒入担体中，在通风条件下用红外灯将溶剂蒸干。当然最好还是用旋转蒸发器蒸去溶剂。在配制过程中应避免搅动担体，否则担体碎裂后，会造成柱效下降。

涂完固定液的担体即可用于装柱。将管柱一端塞好经酸洗、碱洗和硅烷化处理过的玻璃棉，接水泵抽气（开始用较小的抽力，随着柱中担体增加再加大抽力），另一端加一小漏斗缓慢地加入担体。在抽气的同时用一木棍轻轻地敲打管壁，待装到接近柱头后再塞上玻璃棉。

新柱老化后方可使用。其方法是将柱子一端接于进样口并通入5—10毫升／分的氮气，另一端悬空（不要接检测器）。然后用低于该固定液最高使用温度、高于实际使用温度的柱温条件，加热4—8小时。在升高柱温时最好用每分钟2—4℃的速率来程序升温。其目的是在低温下除去柱内的氧气，防止某些固定液（如PEG 20M）在高温下被氧化。老化的目的是除去柱内的杂质，并使固定液在担体上分布得均匀。

2. 毛细柱 毛细柱是一种高效色谱柱。尽管在1958年已出现毛细柱，但由于制作和使用方面的困难，致使它在气相色谱中使用的广泛性不及填充柱。自从Perkin-Elmer公司发展了熔凝石英毛细柱后（fused silica capillary column），它的使用已越来越广泛。

为便于比较，填充柱和毛细柱的主要参数列于表1-1中。

由表1-1可见：毛细柱由于柱子很长，可以得到很高的总有效塔板数（衡量柱效的单位）。毛细柱之所以分离效果好，这是一个主要原因。还需注意到由于柱效高，毛细柱色谱峰更加狭窄（图1-5、1-6），即组分集中在短时间内流入检测器。毛细柱还使用流量衡

表1-1 填充柱和毛细柱的主要参数比较

	填充柱	毛细柱
长度（米）	1.5—6	5—100
内径（毫米）	2—4	0.2—0.7
流速（毫升/分）	10—60	0.5—15
压力降（磅/平方英寸）*	10—40	3—40
每米有效塔板数	2 500（内径2毫米）	3 000（内径0.25毫米）
总有效塔板数	5 000	150 000
柱容量	10微克/峰	<50纳克/峰
液膜厚度（微米）	1—10	0.05—1

* 1磅=0.453592千克，1英寸=0.0254米。

定的氮气作补充气（make up gas），这种气体可不受载气流量改变的影响（可将其流量调至使火焰离子化检测器产生最高灵敏度处）。同时毛细柱的柱流失要比填充柱少得多（因固定液含量下降），这就大大地提高了检测器信噪比。由于上述两点原因，从而使火焰离子化检测器灵敏度大为提高。有人计算过可降低检测极限5—100倍！这就是毛细柱和无分流进样法相结合可以检知极微量成分的原因。作者在昆虫外激素研究中，使用毛细柱和火焰离子化检测器可毫不困难地测得0.1纳克的物质，而填充柱仅可检知5—10纳克物质。

毛细柱的类型很多。它大致可分为两种类型：1）WCOT柱（wall-coated open tubular column）。这种柱子是将固定液直接涂于金属、玻璃或石英管内壁而制成。早期是采用不锈钢或玻璃做为管柱材料。现在已发展起来了以石英做材料的熔硅柱也叫弹性毛细柱。弹性毛细柱柱效高、寿命长（可使用一年以上）、安装方便（不易折断），因而得到广泛应用。还可通过化学键合的办法，将固定液键合到管壁上，这叫键合相弹性毛细柱。这种柱子由于固定液和管壁结合得很牢，甚至可以用溶剂（如戊烷）清洗柱内由于长期使用所造成的污染。也有内径为0.5毫米的大口径弹性毛细柱，这就增加了柱容量，利用它可制备纯度极高的样品。弹性毛细柱已被国内外许多厂商作为商品出售。例如澳大利亚的S.G.E公司、美国的Perkin-Elmer公司、J&W公司和Hewlett Packard公司出品的弹性毛细柱性能都很好。弹性毛细柱由于采用石英作为管壁，故对样品吸附性极小，这点特别有利于分析生物样品。2）SCOT柱（support-coated open tubular column）。它是将柱内壁作适当处理，如将玻璃柱内壁涂一层极细的担体，然后再涂固定液制成。这种柱子的柱容量较大，可直接将样品导入柱中，而无需特殊的毛细柱进样器。它的主要缺点是柱效低、寿命短。

（三）检测器

检测器的种类繁多，根据样品构成、分析目的可选用不同的检测器。常用的类型有两种：热导池和火焰离子化检测器（TCD和FID）。

1. 热导池检测器（TCD） 热导池通常由池体和热敏元件构成。热敏元件为钨丝或铼钨丝。通以直流电后，其温度就会较周围池腔高。组分流入池腔后，组分加载气的热导率与纯载气的热导率是不同的。这就改变了热敏元件的温度，因而其电阻也随着改

变，电路上就产生一信号电压。通过纯载气的参考池和通过载气加样品的测量池分别组成了惠斯登电桥的两臂。通过电桥很容易测到信号电压。

显然载气与试样间热导率差异越大，则检测器灵敏度越高。用氢或氦作载气可获得较高灵敏度。

TCD 对无机气体及有机物均有响应，但它的灵敏度较 FID 低两个数量级。因此对微量成分分析和毛细柱分析不适用。它不会破坏试样，检测后试样还可被回收。

2. 火焰离子化检测器（FID） 这种检测器由喷嘴和收集极构成。两者间有一恒定的直流电压。柱后的有机物流入喷嘴后，即在喷嘴上部的氢焰中燃烧，此时有极微量有机物被电离，收集极便可收集到一股微电流。微电流可经放大器放大，然后再被记录仪记录。

载气（氮）、氢气及空气需有一定比例（对填充柱可为 1：1：10），否则会影响灵敏度或是不能燃烧。

FID 灵敏度高，浓度与检测器响应的线性范围宽，适宜于分析一切能在火焰上被电离的组分。在痕量分析、毛细柱分析上它是极其有用的。

三、气相色谱的分离原理和分离条件选择

气-液色谱（GLC）的分离原理：当一试样在色谱柱行进时，各组分在气相和液相间的分配系数不同，也即在液相中溶解能力不同，因而被多次分配。最后各组分在柱中运行速度不一，经过一定长度的柱子后便被分开。

图 1-2 是一张典型色谱图。图上各部分有专门名称，分析一张色谱图必须了解这些名称。

（1）基线：直线 OK 称为基线。它表示只有载气通过检测器时所得的本底。

（2）峰 1 和峰 2：当被分离组分和载气一齐通过检测器时，所得的信号-时间曲线。

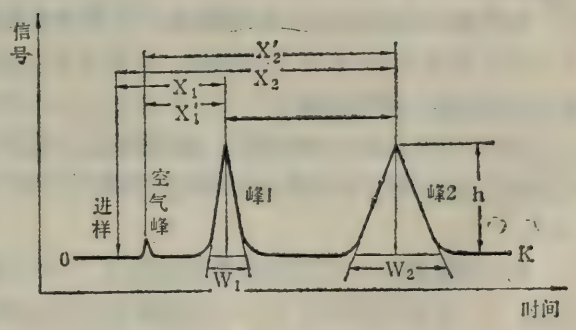


图 1-2 色谱图与色谱图中的常见名称

（3）峰宽：（W_1 及 W_2）峰两侧曲线在拐点所作切线与基线相交部分的线段。

（4）峰高：（h）峰最高点至峰底的垂直距离。

（5）峰面积：峰和峰底所包围的面积。

（6）保留时间：（X_1 及 X_2）从进样开始到峰顶的时间。

（7）校正保留时间：（X_1' 及 X_2'）样品保留时间减去空气峰保留时间。

（8）相对保留值：两色谱峰校正保留时间之比，即 X_2'/X_1'（此处 $X_2' > X_1'$）。

为描述相邻两组分的分离情况，常用分离度 R 作指标。

$$R = \frac{2d}{W_1 + W_2} \tag{1}$$

d 为两峰间距离之差，W_1，W_2 分别为峰 1 和峰 2 的峰宽。

R 是衡量一对物质在柱中分离好坏的总指标，其数值越大，分离越好。当 $R \geqslant 1.5$ 时

则两峰完全分开。组分在柱中分离过程，就是它在固定相中和在流动相中多次分配的过程。两组分能被分开基于它们在某一固定相中有不同的分配系数(在分配平衡时，组分在两相中数量之比)。两组分配系数相差越大，则越易分开。分离也与峰宽有关，即与组分在柱中的扩散速度有关。考虑到这些因素，可得到公式(2)：

$$R=\frac{1}{4}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\sqrt{N} \tag{2}$$

其中 α 为两组分分配系数之比，也即为两组分相对保留值 X_2'/X_1'。N 为有效理论塔板数，是衡量柱效的指标。它可由校正保留时间、峰宽计算得来。

$$N=16\left(\frac{X'}{W}\right)^2 \tag{3}$$

X' 为校正保留值。W 为峰宽。它们的数值可用时间也可用距离单位表示。

影响分离度的因素很多，而且填充柱和毛细柱情况不一样，因此分别加以说明。首先说明一下影响填充柱分离的一些因素。

1. 担体 好的担体有较大的比表面、颗粒度均匀、表面吸附性低、热稳定性好且有一定强度。

常用的是硅藻土担体。可分为红色担体与白色担体两类。白色担体较红色担体比表面要小、强度也低，但表面吸附性低，故适于分析极性化合物。白色担体型号很多，国外有 Celite 545、Chromosorb W、Gas Chrom Q 等。国内有 101、102 等。它是生物样品分析中常用的担体。

担体颗粒的粗细也会影响柱效。细颗粒的担体比表面大，可使柱效提高。一般 2 米长的柱子可用 100—120 目的担体。如柱子再加长时就得用较粗颗粒的担体，否则对载气阻力过大，影响载气流量。

为减少担体表面的吸附性，常用酸洗、碱洗的办法。有时还用二甲基二氯硅烷(DMCS)进行硅烷化处理，以封闭担体表面上的 OH 基。在涂非极性固定液时常用这种担体。

2. 固定液 对固定液有下列要求：1) 在操作温度下，蒸气压低、热稳定性好、呈液态。2) 组分在固定液中有一定溶解力。3) 选择性好，对沸点相近、结构不同的物质有较高的分离能力。

固定液种类繁多，可分为非极性(包括弱极性的如 SE 30、OV-1、OV-101、DC 200 等)，中等极性(如 OV-17、OV-225、CHDMS、PEG 20 M 等)、强极性(如 DEGS、TCEP、OV-275 等)和氢键型四类。近年来又发展了特殊用途的固定液如分离顺、反异构体的液晶类固定液和分离手性化合物的手性固定液。

选用固定液可根据"相似性原则"进行，即固定液性质与被分离物有某些相似性，如官能团、化学键、极性、某些化学性质。此时被分离物在固定液中溶解度大，易分离。

在极性固定液中，物质首先按极性大小被分离(极性小的先流出)，极性相同则按沸点高低分离(沸点低的先流出)。在非极性固定液中，物质则按沸点顺序分离。

在分析复杂的样品时必须使用两根不同性质固定液的柱子。因为某一种固定液只能分开某些组分，而不能分开另一些组分。未分开的组分可以被收集下来，再用另一根柱分离。也可使用混合固定液的办法来解决。

目前多采用低固定液含量的柱子（5—10%）。固定液含量低，可使用较低柱温，此时可得较大的分配系数，从而改善分离。固定液含量与所使用的担体类型有关，使用比表面较小的担体时（如 Chromosorb G）固定液含量就要小。

3. 柱温　柱温太高会使固定液选择性变坏，不利于分离。若降低太多，则保留时间延长而影响分析速度。选择柱温可根据样品沸点来确定。一般柱温可比样品平均沸点低 100 度左右。

对宽沸程混合物则采用程序升温的办法。这就解决了分离效果和分析速度的矛盾。

4. 载气　选择载气要根据分析需要、检测器类型来确定。载气纯度要高。使用任何一种气体作载气都要调至最佳线性流速。氮气的最佳线性流速为 10—12 厘米／秒，氢气为 15—20 厘米／秒。

5. 柱长和内径　柱子增长，有效塔板数 N 也随着增加，因此分离度 R 也增加（公式 2）。但柱子太长则保留时间和柱前压也会增加许多，故柱长受到限制。填充柱一般为 2 米，有时为了需要也可长至 10 米。

柱内径一般为 2—4 毫米。太细柱容量要下降，太粗则柱效下降。

上述各种因素同样会影响毛细柱的分离能力，但毛细柱的基本参数（表 1-1）与填充柱很不一样，因此需加以说明。

（1）固定液：毛细柱能使用的固定液要比填充柱少得多，尤其是极性固定液。因为某些固定液难以完成涂渍。另一方面毛细柱由于有效塔板数极高、分离能力强故也不需要十分繁多的固定液。对一般实验室有一根极性柱和一根非极性柱也就够了。市售的毛细柱有不同的液膜厚度，液膜厚则对分离强挥发性物质有利，柱子分离能力也会增加。但对弱挥发性物质保留时间也会增加。

（2）毛细柱柱温：柱温影响分离的情况与填充柱一样。在毛细柱中一般最高使用温度要较相同固定液的填充柱低一些。使用毛细柱时一般采用程序升温的办法，这一方面是某些进样系统的需要（如无分流进样、柱上进样等），另一方面是毛细柱液膜很薄，采用程序升温不易损坏液膜。

新柱往往要老化一夜，此时当然也需采用程序升温。只要试样中各组分保留时间不是太长就不要使用太高的上限柱温，这样可以延长柱寿命。

（3）柱长和内径：常用的毛细柱一般长 25—50 米。毛细柱因为长度较长，又使用程序升温，所以保留时间一般也较长。超过 50 米的柱子很少采用，因为根据公式（2）分离度仅与有效板数的平方根成正比，即柱长增加到 4 倍，分离度才能增加 1 倍，但此时的保留时间要延得很长。

内径一般在 0.2—0.5 毫米。使用粗柱可增加柱容量，但柱效会降低。

（4）载气：一定要使用高纯度的载气（99.999% 的氮或氢）。使用氮作载气要保持在最佳线速上，过高的线速，则柱效下降。但使用氢作载气可超过最佳线速。这是因为氢气线速较快时对最小塔板高度（长度／塔板数）不致于影响太大。但使用氢气时要特别注意安全。

微量的氧气会破坏某些固定液如 PEG 20M。因此在使用毛细柱做分析时最好在载气进入柱前加一个装有脱氧剂的管子（可从大连催化剂厂购到）。同时还得注意消除微量注射器中的空气。

生物试样中往往含有许多难以挥发的成分。这些难挥发性成分常常不是分析的对象。如果将它们连同挥发性成分一起注入柱中不但影响分离，还会污染柱子，特别是污染毛细柱。此时要求分析者采用蒸馏或凝胶渗透色谱法除去这些难挥发物。如果分析对象就是这些难挥发物，可经化学反应转化为挥发物。例如长键脂肪酸可与重氮甲烷反应生成沸点较低的脂肪酸甲酯。

四、定 性 分 析

各种物质在一定的色谱条件下，都有其自己的保留时间。用未知物和已知物在同一色谱条件分析，看其保留时间是否相同，这便是重要的定性指标。使用相对保留值可以减少分析条件不同造成的误差，此时只需固定液和柱温一致便可以了。

利用共同进样技术也可消除在比较保留时间时因色谱条件差异而造成的误差。此时将未知物与标准物一起注入色谱系统，如果未知物中某一色谱峰明显增高，这个峰便可初步推断就是标准物。此时标准物纯度要高。

脂肪族同系物在同一色谱条件下，其碳数与它们的保留时间（也可用记录纸上色谱峰的保留距离来表示）对数呈线性关系。根据这个规律在有一系列同系物情况下，可用作图法测定未知物是属于同系物中哪一种。

计算一个未知物的 Kova'ts 指数，再与文献值核对，也是一种定性方法。

上述方法均需标样，同时要两个不同性质（极性和非极性）色谱柱分析才为可靠。即使如此，若要对物质进行最后定性还需结合其他方面的（如光谱分析）分析数据。

对一结构完全未知的物质，可用反应色谱法（用 GC 来检查未知物是否能与某试剂起反应，来得到与结构有关的信息）、或进行 GC-MS、GC-IR、核磁共振等分析来定性。近年来毛细柱 GC-MS 已发展到成熟阶段，无论是毛细柱的分辨力或是质谱的灵敏度都是极高的。此时质谱仪可被看成一个检测器，由此而得的结构信息要比 GC 多得多。

五、定 量 分 析

根据在某一色谱条件下，某物质在样品中的含量与其峰高或峰面积成正比的关系，可进行定量分析。

常用的方法有外标法、内柱法和归一化法。外标法是先测得某标准物不同浓度的峰高或峰面积并作出浓度—峰高（峰面积）标准曲线。然后在同一色谱条件下，用未知含量物的峰高或峰面积与其相应的曲线核对来定量。内标法是用某已知含量的标准物与未知含量的样品一起注入色谱柱，可根据已知含量物和未知含量物峰面积（或峰高）之比来计算出含量。当标准物和待测物不是同一物质时，需考虑检测器对不同物质响应值差异。可用校正因子对此差异校正。校正因子可由文献中查出。归一化法可用于同系物中，这时各组分均能分开且响应值近似，因此某一组分的百分含量即为它的峰面积与总峰面积之比。

影响定量的因素很多，像进样技术、仪器工作稳定性、峰高或峰面积测量误差等。分析时必须注意这些因素。

目前很多气相色谱仪都附有微处理机，利用它可自动记录各色谱峰的保留时间和相

对浓度。因此定性、定量工作可做得既准又快。此外还可用输入程序的办法自动控制色谱分析中的许多条件，使分析高度自动化。

六、制备气相色谱

制备气相色谱是利用色谱柱的高分离能力来对混合物中某一或某几个成分进行纯化。虽然光谱分析能够提供很多结构方面的信息，然而它却需要纯样。近年来高分辨毛细柱已广泛地应用于气相色谱-质谱（GC-MS）系统，但对组成十分复杂的样品来说经一次毛细柱分离，也难于保证每个色谱峰仅含一种成分。在生物学研究中，许多生理活性物质或药物也需纯样进行生物测定。气相色谱是制取纯样的有力工具之一。

生物体中许多成分是难以大量获得的。例如昆虫外激素只能在每只昆虫中获得纳克数量级的样品。近年来计算机被应用于光谱分析仪器中，使得它们的灵敏度大为提高。所以微量样品（样品量：0.1 微克—1 毫克）的制备在气相色谱中是相当重要的。然而一般书籍中很少涉及这点。在微量样品的 GC 制备中有几个重要问题必须加以说明。

1. 色谱柱　用于微量试样纯化的柱子和一般分析柱没有两样。柱温也与分析时的柱温相仿。载气流速以最佳线速为宜，过高的流速不但不利于分离，而且还会使冷凝效率降低。

2. 分流器　分流器可使大部分样品流入收集器，而仅有少量样品流入检测器。R. G. Brownlee 所报道的一种可调分流比的分流器很适宜于微量试样的纯化。不少气相色谱仪也带有柱后分流器，像 Perkin-Elmer 公司的 990 气相色谱仪便附有这种装置。它的构造如下：

载气自柱后流出后进入位于柱后和检测器之间加热区中的一个三通块中（三通块内腔很小）。载气在三通块中分为两股，一股由不锈钢管导入检测器，另一股被通入收集口。分流比可由不锈钢管的内径和长度来调节（例如可调至 97：3）。进入 FID 的载气因为流量很小（1—5 毫升／分），需加补充载气。这就必须加入另一个三通块。在第二个三通中混入补充载气后（氮），再流入 FID。补充载气流量可稍高于氢气流量。加入补充载气的目的是防止色谱峰扩展、增加检测灵敏度。通至收集口的不锈钢管开口于检测器下方的加热区内。它被连于一个聚四氟乙烯接头上。接头的另一端可接玻璃收集管。

3. 收集器　因为回收的样品量很少，故利用内径 1—2 毫米、长 30—40 厘米的薄壁玻璃管即可。玻璃管的一端插入聚四氟乙烯接头上。在离收集口 10—20 厘米处放一干冰盒，收集管（数目视需收集多少组分而定）被包埋于干冰中。收集口处温度要高于柱温（实际上即 FID 的温度，通常为 200—250℃），以避免样品在此处冷凝。收集管需有温度梯度变化，故干冰不可放得离收集口太近。

在玻璃管中冷凝的收集物可用适当的溶剂洗下（可根据光谱分析、生物实验要求选定溶剂），也可将收集管两端在火焰上封好，以备后用。在样品收集过程中应尽量避免水气进入收集管，过多的水分有碍于光谱分析。

作者曾用月桂酸甲酯、十四醇作标样，在一微克进样量下，用这种收集器可分别回收到 60—80%、40—60% 的两种样品。试样的损失主要是在测定回收率时浓缩样品发生的。因此洗脱所用的溶剂量要尽可能减少（对内径 1.5 毫米的管子 50—100 微升即可）。

对毫克量级的样品，可得80—90%的回收率。

图1-3是马尾松毛虫性外激素提取物的OV-101柱色谱图和不同馏分的触角电位（一种测定外激素的电生理学方法，简称EAG）分析图。马尾松毛虫性外激素乙醚提取物经氮气共蒸馏（Nitrogen sweep co-distillation）后，被注入3% OV-101柱。所收集到的色谱馏分再进行EAG测定，绘出图1-3。图1-4是6号EAG活性峰再经1.5% CHOMS柱

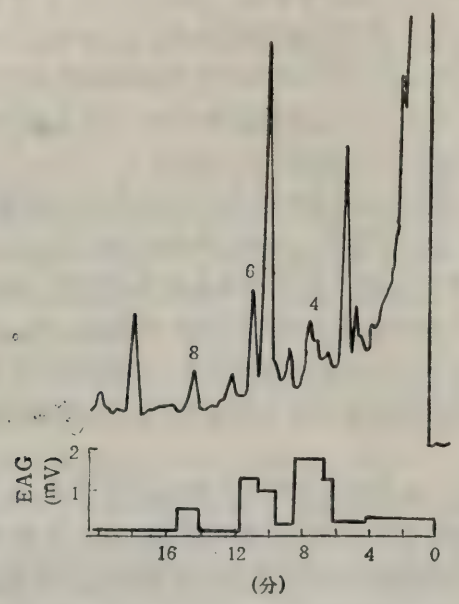


图1-3　马尾松毛虫性外激素提取物GC-EAG分析

色谱柱：3%OV-101，担体60—80目Chromosorb W-AW-DMCS，柱长2米，内径2毫米，不锈钢柱。柱温：145°C→1.5℃/分→17分后3℃/分至220℃。氮气流速：10毫升/分。检测器：FID。

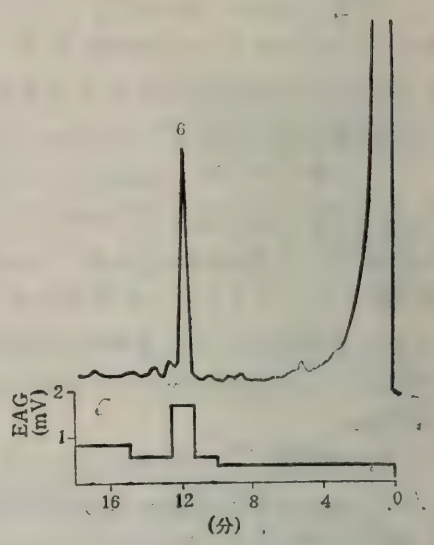


图1-4　6号峰的再分离

色谱柱：1.5%CHDMS，担体60—80目405担体，柱长2米，内径2毫米不锈钢柱。柱温：130°C→2℃/分→170°C/分。氮气流速16毫升/分。检测器：FID。

进行第二次分离、制备，对各馏分进行EAG测定后绘出。经两次色谱分离后该成分纯度便很高了（这点已为质谱分析所证实）。图1-3中的三个EAG活性峰经仪器分析和生物测定已被鉴定。它们的化学结构分别为：顺5，反7-十二碳二烯醇（峰4）、顺5、反7-十二碳二烯乙酸酯（峰6）和顺5，反7-十二碳二烯丙酸酯（峰8）。

通过上例看出：复杂的生物样品常需两根不同性质的色谱柱来纯化。有时甚至要用4—5根不同的色谱柱。

七、气相色谱仪在生物学中的应用

James和Martin早在50年代已用气-液色谱分离了脂肪酸、胺类等生物物质。随着仪器发展和商品化，气相色谱在生物学上的应用也越加广泛。

某些生物体中成分经适当收集法收集后，直接可注入色谱柱中分析。图1-5是将美洲榆树树干中挥发物经抽气收集于Porapak Q（一种吸附性有机聚合物）中，然后用戊烷洗下，注入一根甲基硅酮毛细柱所得色谱图。图中绝大部分色谱峰是单萜烯和倍半萜烯

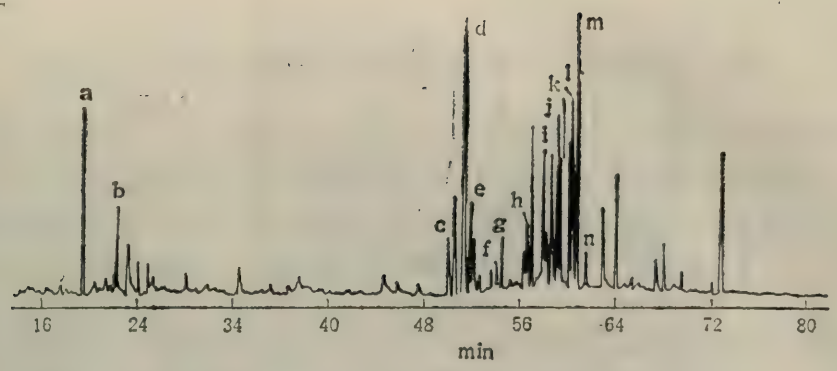


图 1-5　美洲榆树中挥发性成分毛细柱 GC 色谱图

OV-101 50×0.21毫米 ID毛细柱，柱温35℃(1.67分钟)程序升温2℃/分到190℃氦流速 3 毫升/分。FID 250℃，进样口150℃(无分流进样)。

化合物。这些物质经填充柱被分为纯品、并经光谱分析等手段所鉴定。

图 1-6 是 3 只亚洲玉米螟外激素腺体提取物毛细柱 GC 分析图。2、3 为其外激素成分反 12-十四碳烯乙酸酯和顺 12-十四碳烯乙酸酯。经外标法测定每个色谱峰 (2,3) 约为 7 纳克。无分流进样和弹性毛细柱合并应用，使人们对外激素成分构成、比例和绝对含量很快便一目了然。

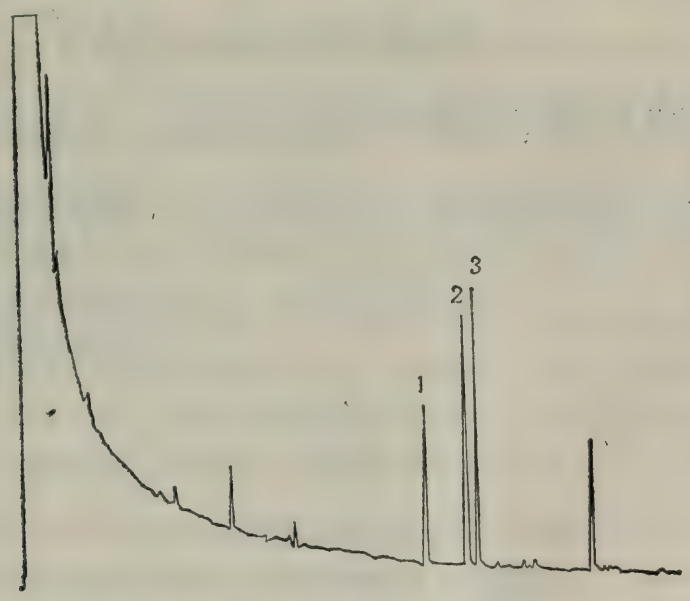


图 1-6　亚洲玉米螟性外激素的 GC 分析

PEG 20M 30米×0.2毫米弹性毛细柱；柱温80℃(1分钟)程序升温3℃/分 到160℃；氢气(载气)线速47厘米/秒；无分流进样。检测器：FID。

气相色谱仪还可用于对某些疾病的诊断上。图 1-7 是两个人体尿液中有机酸成分色谱图。病人尿液中（上图）含大量非正常代谢产物—— 3 羟基异戊酸 (3-HIVA) 和 3-甲基巴豆酰 (3-MCG)。推测可能是缺少 3-甲基巴豆酰羧基酶。

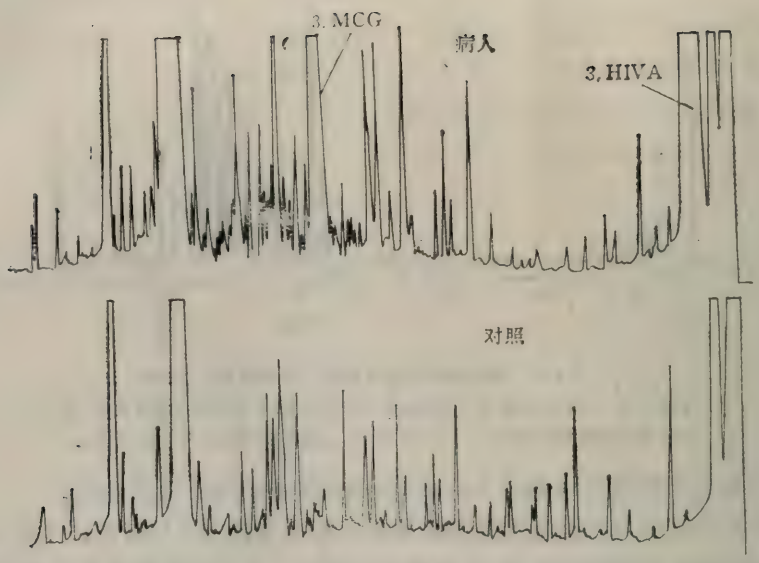


图 1-7　病人(上图)和健康人(下图)尿液有机酸毛细柱色谱图

八、某些国内外气相色谱仪简介

目前国内外各厂商生产的气相色谱仪型号极其繁多。这里仅就作者所知，介绍几种新型号仪器。

HP 5890 A 是由美国 Hewlett Packard 公司生产的一种质量优秀的气相色谱仪。它采用了先进的色谱学、电子学技术，使色谱分析获得高精确度、高重复性、并且操作简便。可接火焰离子化、热导、电子捕获和氮磷检测器。目前有好几种型号的气相色谱-质谱联用仪都采用它作为色谱部分。用 HP 3393 A 计算机化积分仪与它连接，可组成一个自动化色谱分析系统。它还具有下列性能：可采用毛细管柱分流／无分流进样器、毛细柱柱上进样器、填充柱进样器，以适应于各种不同的分析目的；可随时显示出仪器各部分温度和各种气体流量；具有单柱补偿功能，易得到平直基线；具有自检功能，可确定有无故障和故障所在处。

由 Philip 公司生产的 PU 4550 型气相色谱仪的基本构造与 Pye Unicam 204 型相似，但采用了微处理机控制色谱参数，并附有键盘和多功能数字显示器，因而能显示各种参数和保留时间。也可根据需要配备毛细管柱分流／无分流进样器及微量样品收集装置。这种仪器数据重复性好、经久耐用。

SP 3400 型气相色谱仪是由北京分析仪器厂从美国 Varian 公司引进、生产的。它除具有现代色谱仪所具有的一般特点外，还特别适于毛细管柱色谱分析。采用了先进的毛细管柱上进样器，并使用溶剂聚焦技术可使进样量扩大到20微升。

Perkin-Elmer 的 SIGMA 300 型、Varian 的 3700 型、Hewlett-Pakard 公司的 5880A、也都是性能较好的气相色谱仪。

九、气相色谱仪附件的选择和安装条件

检测器可根据要求由生产仪器厂家购得。填充色谱柱可由主机生产厂家购得，也可自己配制。自行配制的好处是完全可根据需要来选定担体、固定液和固定液含量。各种担体和固定液都可由仪器生产厂家或试剂公司购得。毛细管柱如自己动手制作，较为复杂，可向有关厂商订购。澳大利亚的SGE公司、美国的Hewlett Parkard、Pekin-Elmer、J&W Scientific等公司都生产性能良好的各种毛细柱。

聚固色谱柱的螺母、聚四氟乙烯或石墨垫圈，以及进样器上的硅橡胶垫片都是必不可少的零件，这些都可由生产主机的厂家购得。

新型气相色谱仪体积都很小，即使加上记录仪或微处理机，所耗空间也很小，有一个长1.5米、宽70厘米的实验台便够了。对实验室无特别要求，只要周围无腐蚀性气体、电源稳定即可。在安装一台新仪器前应备齐下列附属装置：

(1) 符合仪器要求的电源(包括电压及功率)。

(2) 如用火焰离子化检测器，要备好氮气、氢气和压缩空气。对填充柱来说纯氮、纯氢即可。对毛细管柱分析要用高纯氮(含量为99.999%)和高纯氢(含量为99.99%以上)。

(3) 气体连接管。最好选用内径为2毫米的紫铜管或不锈钢管。使用前要彻底清洗内壁，特别是要除去管内的油污。

(4) 气体净化管。净化管一般为长约20厘米、内径约5厘米的黄铜管或不锈钢管，内装净化剂制成。净化剂可选用活化后的分子筛(5A)或活化后的硅胶加分子筛，以除去气体中的水分和极性有机物。净化压缩空气最好用分子筛加活性炭，以除去水和烃类。净化器要定期活化，即通入氮气于150℃以上烘烤10—12小时。在使用聚乙二醇毛细管柱时应使用脱氧管(可选用大连催化剂厂的QJG-I高效脱氧管)，以除去载气中微量的氧气。

(5) 微量注射器。常用的有1微升、10微升、和50微升。

(6) 记录保留时间的秒表。

参 考 文 献

〔1〕中国科学院大连化学物理研究所，气相色谱法，1973，科学出版社，第一版。

〔2〕H M. McNair and E. J. Bonelli, Basic Gas Chromatography, 5th ed, 1969, Varian Aerog-raph.

〔3〕R. R. Freeman, High Resolution Gas Chromatography. Znd ed, 1981 Hewlett-Packard Company。

〔4〕松限昭，气相色谱实践，韩焕珍译，1983，江苏科学技术出版社，第一版。

〔5〕J. G. Millar, et al., Components of Moribund American Elm Trees As Attractants to Elm Bark Beetles, *Hylurgopinus rufipes* and *Scolytus multistriatus*. *J.of Chemical Ecology*, **12**(3), 1986.

〔6〕Robert G. Brownlec and Robert M. Silverstein, A Micro-Preparative Gas Chromatographand a Modified Carbon Skeleton Determinator, *Analytical Chemistry*, **40**, 2077—2079, 1968。

〔7〕中国科学院动物研究所昆虫激素研究室，马尾松毛虫性外激素的触角电位(EAG)活性组分的分离、鉴定与合成，科学通报，**24**，1004—1008，1979。

第二章　低压液相色谱仪

賀宝珍

低压液相色谱法（LPLC）是一种通用的，而且很简单的方法。生物化学近代研究史上每一重要发展，都离不开用低压液相色谱法。软凝胶法目前仍然占很大优势。对基因工程的物质提纯，是重要的。然而，软凝胶技术在速度、分辨率上相对来说比近期发展的高效液相色谱法（HPLC）要低的多。虽然如此，软凝胶技术还是用途广泛，是分离生物大分子的最基本方法，每个实验室都有条件配备这种简单设备，从事生物大分子分离。

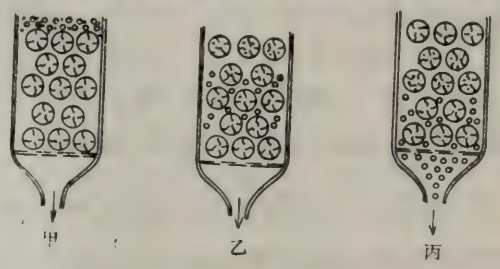
生物大分子结构复杂，尤其是它的混合物如用凝胶过滤色谱法（gel filtration chromatography），离子交换色谱法（ion exchange chromatography）和亲和色谱法（affinity chromatography）。要分离纯化一个样品，常要使用多种分离技术。

一、凝胶色谱法

（一）原理

凝胶层析是一种液体柱色谱，利用这种方法，可根据样品中各种物质分子量大小的不同，将样品通过多孔胶床来达到分离的目的。方法简单，操作方便，回收率高，应用于生物化学物质的分离及蛋白质分子量的测定。

物质分离效果常用洗脱曲线来表示，所以分离特征直接和洗脱体积有关。一般，一个物质的洗脱体积，不会超过总的床体积。凝胶层析的简单原理用图 2-1 表示。



甲：待分离混合物上柱　乙：当用溶剂洗时大分子随溶剂流下来，小分子进入凝胶　丙：大分子流出柱床，小分子在行进中

图 2-1　凝胶层析简单原理

（二）凝胶的类型、性质及厂商

凝胶是经交联而具有三维网状结构的多聚体，充满水的胶态物质。

层析凝胶具有如下性质：1）惰性，凝胶与生物大分子蛋白质、核酸不发生作用。2）在化学上稳定，凝胶可反复使用数月、数年，同一层析床也可反复使用，并且其 pH 稳定的范

围广，还有一定的机械稳定性。3）低的电荷。4）广泛的分部范围，被分离的物质是多种多样的，需选择一定类型的凝胶。5）凝胶颗粒要小，分布要均匀。6）有一定机械强度。

1. 交联葡聚糖凝胶 Sephadex 葡聚糖凝胶是一种珠状的凝胶。它是用环氧氯丙烷交联葡聚糖制成的。不同型号的交联葡聚糖用G表示（如 G-200），在G后面的阿拉伯数字为凝胶的得水值再乘 10；Sephadex 葡聚糖凝胶很容易在水中和电解质溶液中溶胀；Sephadex 有不同粒度，粗级和中级的凝胶用于制备性色谱，超细级用高分辨率柱色谱。Sephadex 在化学性质上稳定，它不溶于一切溶剂，但在强酸中它的糖苷键易水解，在 0.02 mol/L 盐酸中低温保存半年不发生变化，在碱性溶液中十分稳定，长期接触氧化剂易使羟基氧化成羧基，影响它的特性，应避免使用，它耐热可加热灭菌，它的机械强度取决于交联度 G-10，G-15 是刚性的，G-200 凝胶可被压缩，交联葡聚糖凝胶具有不同分离范围，分子量可从 0—700 一直到 5 000—800 000，得水值（为 1 克干重凝胶颗粒充分溶涨时所需水的毫升数）大的凝胶（Sephadex G75 到 Sephadex G200）可分离大于 10 000分子量的蛋白质，而得水值低的凝胶（Sephadex G-10 到 Sephadex G-50）只用于肽或脱盐，Sephadex 葡聚糖凝胶的性质见表 2-1。

表 2-1 Sephadex葡聚糖凝胶某些技术数据

Sephadex葡聚糖凝胶的类型和级别*		干珠直径（微米）	分级分离范围（分子量）		柱床体积（毫升/克干葡聚糖凝胶）
			肽和球状蛋白	葡聚糖	
G—10		40—120	—700	—700	2—3
G—15		40—120	—1 500	—1 500	2.5—3.5
G—25	粗	100—300	1 000—5 000	100—5 000	4—6
	中	50—150			
	细	20—80			
G—50	粗	100—300	1 500—30 000	500—10 000	9—11
	中	50—150			
	细	20—80			
	超细	10—40			
G—75		40—120	3 000—80 000	1 000—50 000	12—15
	超细	10—40	3 000—70 000		
G—100		40—120	4 000—150 000	1 000—100 000	15—20
	超细	10—40	4 000—100 000		
G—150		40—120	5 000—300 000	1 000—150 000	20—30
	超细	10—40	5 000—150 000		18—22
G—200		40—120	5 000—600 000	1 000—200 000	30—40
	超细	10—40	5 000—250 000		20—25

* 上述各种型号的凝胶生产厂有 Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA; Pharmacia 瑞典。

2. 琼脂糖凝胶 Sepharose 琼脂糖是由琼脂糖制成珠状凝胶。天然的琼脂经纯化除去带电荷的多糖制备成琼脂糖凝胶。琼脂糖中凝胶的结构是氢键，而不是共价键，氢键断裂剂（尿素）能破坏琼脂的结构。琼脂糖稳定性很差，商品以含水状态供应。它在水和盐溶液中在 pH 4—9 范围内稳定。不能用硼酸缓冲液。对热不稳定（40℃ 以上熔化），在

冰冻时损坏其珠状结构，不能用加热灭菌，可用化学法灭菌。

瑞典 Pharmacia Fine Chemicals 公司生产一种交联琼脂糖凝胶，其型号有 Sepharose CL-2B、Sepharose CL-4B 和 Sepharose CL-6B。它的特点稳定，可用浓尿素或盐酸胍溶液以及有机溶剂进行分析，在 pH 3—12 范围内稳定，并可以在 110—120℃ 高压灭菌。另外瑞典 LKB 公司生产一种 Ultrogel 凝胶，它是用聚丙烯酰胺凝胶作成三维空间格子，格子中间填充琼脂糖凝胶。因聚丙烯酰胺为骨架，所以机械性能比纯琼脂糖凝胶高，粒度也小，分辨率也较高。有四种型号，其规格见表 2-2。

表 2-2　Ultrogel凝胶的某些技术数据

型　号	聚丙烯酰胺含量（%）	琼脂糖含量（%）	颗粒直径（微米）	有效分段分离范围
AcA22	2	2	均为60—140	$10^5-1.2\times10^6$
AcA34	3	4		$2\times10^4-3.5\times10^5$
AcA44	4	4		$10^4-1.3\times10^5$
AcA54	5	4		$5\times10^3-7\times10^4$

pharmacia Fine Chemicals 公司还生产 Sephacryls-200，它是一种超细颗粒的凝胶，可用于分离蛋白质、多糖及其它生物大分子，可用水、有机溶剂、表面活性物质、尿素、盐酸胍溶液进行分析。可在 120℃ 高压灭菌。因琼脂糖具有极大孔径，可分离一些分子量极高的物质(如病毒)。除了瑞典生产外，还有美国生产 Bio-Gel P (1.5M、5M、15M、50M、150M)；Super Ago-Gel，英国生产 Sagava C10 (8、6、4、2)，丹麦生产 Gelarose。

3. 聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Gel P)　聚丙烯酰胺凝胶是一种合成凝胶。商品为颗粒状干粉供应。丙烯酰胺为骨架，交联剂次甲基双丙烯酰胺。根据溶涨性质和工作范围的不同，市售共 10 种 (P-2、P-4、P-6、P-10、P-30、P-60、P-100、P-150、P-200、P-300)。其性质见表 2-3。这种凝胶不溶于水和有机溶剂，也不和浓盐、尿素、盐酸胍溶液反应。它

表 2-3　聚丙烯酰胺凝胶某些技术数据

型　号*	排阻的下限（分子量）	分级分离的范围（分子量）	膨胀后的床体积（毫升/克干凝胶）
Bio-gelP-2	1 600	200—2 000	3.8
Bio-gelP-4	3 600	500—4 000	5.8
Bio-gelP-6	4 600	1 000—5 000	8.8
Bio-gelP-10	10 000	5 000—17 000	12.4
Bio-gelP-30	30 000	20 000—50 000	14.9
Bio-gelP-60	60 000	30 000—70 000	19.0
Bio-gelP-100	100 000	40 000—100 000	19.0
Bio-gelP-150	150 000	50 000—150 000	24.0
Bio-gelP-200	200 000	80 000—300 000	34.0
Bio-gelP-300	300 000	100 000—400 000	40.0

*生产厂：Bio-Rad Laboratories, Richmond, California U S A.

在 pH 2—11 范围内稳定，在高温时能使酰胺基大量水解，产生羧基，增加了离子交换能

力，酸性、碱性很强物质、芳香类化合物均能被吸附。

（三）凝胶层析的应用

凝胶层析广泛用在生物化学、医学、工业等各领域，可以用于分离、制备。

1. 生化领域中用于分离　1）缓冲液交换，样品可以转换到合适的起始缓冲液中以便进行下一步的离子交换色谱、亲和色谱、疏水互相作用色谱。2）去盐，蛋白质、多糖、多肽等可以在冷冻干燥或浓缩之前进行脱盐。3）核酸制剂中酚的去除。4）去除低分子量标记物如 ^{125}I。5）大分子和低分子量反应物之间反应的终止。6）从酶中去除反应产物、辅助因子、抑制剂等。

2. 分子量测定　它能在各种不同 pH、离子强度、温度等范围内测定天然和变性球状蛋白的分子量和分子大小。需要一根充装了合适凝胶的柱体，还要一系列的蛋白标准品来校正柱体。凝胶以交联葡聚糖凝胶 G-100、G-200 为主。

3. 测定高聚物的分子量分布　主要用在合成多聚体工业。用交联葡聚糖凝胶能根据分子量来分离分子。

4. 蛋白质络合物的鉴定　蛋白质相互之间的结合和蛋白质与低分子溶质之间的结合。凝胶层析可从反应混合物中把过量的反应剂除去。对蛋白质多聚体及酶与辅酶络合物的研究是十分有效的方法。

5. 其他　分离细胞和颗粒物质；大分子核酸的应用；制备一定量的纯物质如 γ-球蛋白、抗原抗体的络合物；酶的分离提纯。

（四）凝胶过滤的实验操作

1. 设备　凝胶层析所使用的设备简单，一般实验室都具备凝胶层析的条件。

（1）层析柱：一般用玻璃管或有机玻璃管，柱的底部用砂芯滤板或玻璃纤维或尼龙网衬托（见图 2-2），以防止凝胶的流失和污染洗脱液。层析柱滤板下的死体积尽量小，减少洗脱峰的扩散，滤板要选择合适，滤板不能被堵塞，也不能使凝胶流失，出液口要细口径管，一般内径1毫米。

（2）控制流速装置：恒压洗脱瓶，随着层析时间的增加，保持流速恒定。在玻璃容器顶端插入一根和大气相通的玻璃管（见图 2-3）。瓶内贮存洗脱液，使瓶内液面至空气管末端之间流动时，保持恒定压力。另外用恒流泵来控制流速，常用蠕动泵，通过管道输送液体。

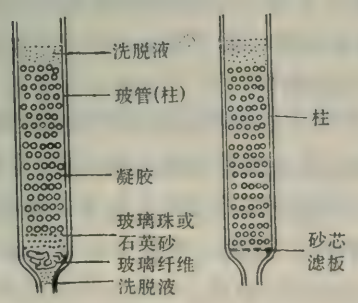


图 2-2　色谱柱

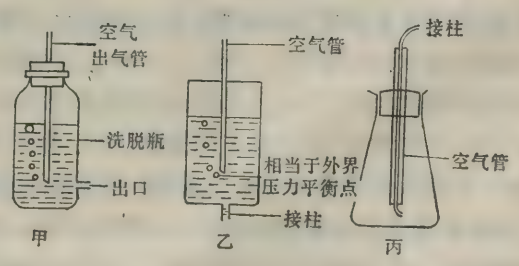


图 2-3　恒压洗脱瓶

(3) 收集洗脱液装置：洗脱液经部分收集器逐管收集。洗脱液流经分光光度计中流动池，可鉴定出组分的光吸收，记录仪上划出不同的峰形。

2. 选择实验条件

(1) 凝胶类型：对于组别分离，只要样品进行粗分离如脱盐和缓冲剂交换。因分子量差异很大，常用交联葡聚糖 G-25、G-50，生物凝胶 P-6 和 P-10。对于分级分离是指分离一些分子量比较近似的物质，要仔细选择凝胶，要考虑被分离物质的分子量与各种凝胶的选择性曲线，在分子量测定时选择的凝胶应与预期的样品分子量落在选择性曲线的线性部分，并处于校正标样合适范围的中部。

(2) 凝胶粒度的选择：在组别分离时，选择较粗粒度（100—300 微米）；在分级分离时，要求颗粒均匀分布，用细粒度合适，分辨率高。

(3) 层析柱的选择：对组别分离用短柱 20—50 厘米高度，而分级分离时用 100 厘米左右，柱内径约为 2.5 厘米合适。瑞典 Pharmacia 生物技术公司生产一系列凝胶过滤的标准柱体，上海锦华实验器械厂生产系列层析柱及柱转换接头。

(4) 样品体积为柱床体积 1—5%，使起始区带非常窄，在脱盐时可高达 30%左右总柱床体积。

3. 实验操作

(1) 凝胶准备：供应凝胶是干粉，使用前必须在溶剂中充分溶胀，溶胀时，不应剧烈搅拌，否则珠破碎。为了加速溶胀，可用加热法在沸水浴中加热 1—2 小时，即可灭菌又可去除缓冲液中气泡，也可自然溶胀 24 小时以上。琼脂糖凝胶供应时已溶胀好的，溶胀了的凝胶放低温以防长霉。

(2) 装柱：这是凝胶过滤中极为关键的一个步骤，充装不良会引起流速不匀，区带扩散 分辨率下降。交联葡聚糖、生物胶-P 商品都是干粉，在装柱前要溶胀。将凝胶悬液调节成合适的浓度，一般含有 75% 沉积的凝胶，用抽真空除气，将柱安装在架上，保持垂直，保证没有空气泡存留在滤板下的死空间内，将洗脱液装入柱内，由下口流出，使空气排除。然后关闭出口，柱床内保持 1/3 洗脱液，在柱顶上放一个漏斗，将凝胶悬液一次加入漏斗内，自然均匀沉降于柱床内，洗脱液充满上面空间，接上洗脱液瓶，平衡柱用 2 到 3 倍于床体积洗脱液，控制适当的流速。

(3) 填充后柱床检验：检查柱床最简单的方法，是用灯照柱床，肉眼观察床是否均匀。更精确检查柱床是用一些标准有色物质来观察区带移动的均匀程度和拖尾现象，一般采用蓝葡聚糖 2 000，(blue dextran)，浓度为2毫克/毫升。

(4) 加样：样品浓度与凝胶和液体之间的分配系数无关，所以可用高浓度的样品，但太浓由于溶质相对粘度影响，影响峰形。一般溶质对洗脱液的粘度不能大于 1.5—2.0。样品体积为柱床体积 1—5%。上样也是凝胶层析的关键性操作。对于组别分离只要保持床表面的稳定，用人工加样，让洗脱液流至床表面以下 1—2 毫米时，用滴管加到床表面以上2—3厘米时，接上恒压样品瓶，打开出口，使样品加完，接上恒压洗脱液瓶，调节流速。对于分级分离可用人工法直接加入床表面，但要小心，不要搅混床表面，若柱床表面不均匀，将使分离后的区带不均匀，分辨率下降，也可用加样杯，可避免扰乱柱床表面，瑞典 Pharmacia 柱体带有这种加样杯。还有一种加样方法，在洗脱剂液面下加样，样品的密度必须比洗脱剂大，否则，在样品中加入 1 %葡萄糖、蔗糖或氯化钠惰性材料，使密度增大。

用一支连结了一段毛细管的注射器，将样品抽入注射器，再吸入少量空气，管插入柱床表面，慢慢地加入样品，开动液流。另外可用柱塞接管加样法，Pharmacia 柱体配有 LV-3，LV-4 阀接装注射器。加完样后用收集器收集，同时，用光度计鉴定。

(5) 凝胶储存及防止微生物生长：交联葡聚糖、琼脂糖都是多糖类物质，宜于生长微生物。流动的柱床是不易长菌的，在凝胶悬液和缓冲液中应加防腐剂，它不应与样品起作用，也不能与凝胶起作用。最常用防腐剂是叠氮钠 (NaN_3) 0.02%。另外，还有 0.02%三氯叔丁醇、0.01% 硫柳汞、洗必泰。

(6) 凝胶的洗净：在操作中常有一定的杂质污染凝胶或在柱床表面，蓝葡聚糖易吸附在凝胶上，用血清白蛋白洗脱。如果凝胶柱床表面有不溶物沉淀，就用人工挖掉表面凝胶。若整个柱有污染，用 0.2mol/L 氢氧化钠和非离子性洗涤剂来清洗，严重污染需再生处理，交联葡聚糖凝胶用温热 0.5mol/L 氢氧化钠和 0.5mol/L 氯化钠混合液处理，聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶由于遇酸、碱不稳定，用盐溶液处理。

二、离子交换柱层析

要从复杂混合物中分离出十分相似的生物分子需要用高分辨率技术，离子交换层析可满足这种需要。

(一) 原理

离子交换是指在固相和液相之间发生的可逆的离子交换反应，它可用来分离各种可解离的物质。离子交换剂是一种高分子的不溶性骨架，它带有若干活性基团，骨架的高分子有树脂、纤维素、葡聚糖、琼脂糖或无机聚合物。活性基团有酸性的或碱性的。凡含有酸根的是阳离子交换剂如磺根 ($—SO_3H$)、羧根 ($—COOH$)、阴离子交换剂含有碱根如胺基 ($R—NH_2$……)。

在一定条件下，离子交换树脂吸附物质与在溶液中的物质达到平衡之比叫分配系数。

$$K_d = \frac{M_s}{M_l}$$

M_s 和 M_l 分别表示单位重量离子交换树脂和单位体积溶液中溶质的摩尔数。待分离的各种物质的分配系数，应有足够的差别。离子交换过程通过可逆吸附来完成。首先样品被吸附，因样品各组分带有不同电荷与交换剂有不同的亲和能力，用不同洗脱液就可将其各组分分开（见图 2-4）。图 2-4 中第一步表示用反离子平衡，第二步表示反离子被样品交换，样品吸附，第三步一种物质被解吸，第四步用梯度洗脱剩余物质，第五步再生平衡。

(二) 离子交换树脂的选择及操作

1. 离子交换树脂种类、性能及厂商

(1) 聚苯乙烯为骨架磺酸型阳离子交换树脂：美国 Sigma Chemical Company，Amberlite IR-120，Dowex 50。英国 Zerolit 225，Zeokarb 225。日本神胶1号。苏联 KY-2。上海树脂厂 732、734。上海有机所的多孔强酸 1 号。南开大学的南开强酸 1 号。华东化工学院的华东强阳 42 号。

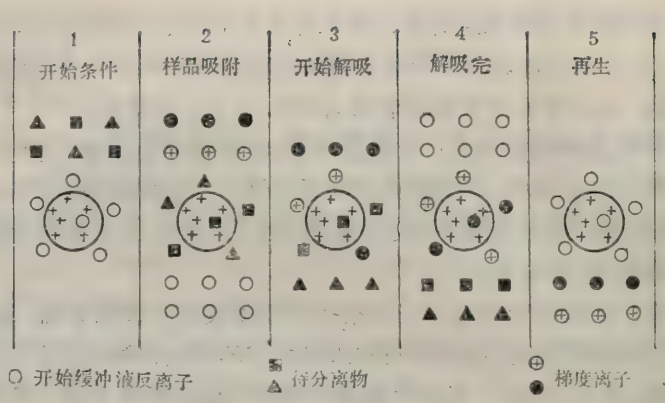


图 2-4　离子交换色谱法简单原理

(2) 葡聚糖为骨架的弱碱性阴离子交换剂，美国 Sigma；瑞典 Phamacia：Sephadex A-25，A-50。强碱性阴离子交换剂 A-25，A-50。弱酸性阳离子交换剂 CM-Sephadex C-25，C-50。强酸性阳离子交换剂 SP-Sephadex C-25，C-50。

Sephadex 离子交换剂在所有溶剂中不溶，在水、盐溶液、有机溶剂、碱、弱酸溶液中稳定。要避免 pH 2 以下使用，热稳定，可在 120℃ 30分钟高压灭菌。

(3) 琼脂糖为骨架：瑞典 Phamacia 产 DEAE-Sephrose CL-6B，CM-Sepharose CL-6B。

这种树脂不溶在所有的溶剂中，pH 3—10 范围内在水、盐溶液、有机溶剂中稳定，可在 110—120℃ 高压灭菌。

(4) 纤维素为骨架：美国 Sigma 产 DEAE-Sephacel，PEI-C，QAE-C，DEAE-C，P-C。瑞典 DEAE-Sephacel。英国 AE-C。联邦德国 DEAE-C。上海有机所 DEAE-C。

此树脂在 pH2—12 水溶液中稳定，可在 pH7 120℃ 高压灭菌 30 分钟。

2. 离子交换剂的选择及操作

(1) 使用时选择哪一种离子交换剂，考虑样品组成的稳定性，预先知道分离物质的等电点 P_I。若 $P_I = 5$ 则用阴离子交换剂，用 pH6 洗脱液洗脱，用阳离子交换剂，就用 pH4 洗脱液洗脱（见图 2-5）。若未知蛋白质等电点用试管方法选择离子交换条件，试管内加些 Sepharose 或 Sephacel 离子交换剂，用不同 pH 缓冲液洗脱，对于阴离子交换剂用pH5—9，阳离子交换剂用 pH4—8，蛋白质在某一 pH刚被吸附就选择这一点，如 pH6.5（见图2-6）。样品分子量小于10 000，用 Sephadex C-25，A-25 进行分离，分子量在 10 000—100 000 范围用 Sephadex A-50。C-50 进行分离，分子量大于100 000 用 Sephadex A-25，C-25 进行分离，选择缓冲液离子强度方法与选择pH的一样，用试管方法，对于 Sephadex，每管间隔从 0.05—0.5mol/L NaCl，对于 Sephacel、Sepharose，从0.01—0.3mol/L NaCl，选择紧密吸附的那一种。

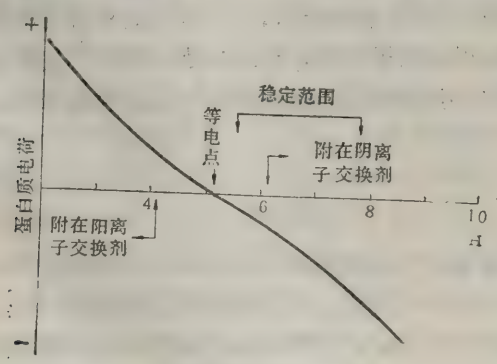


图 2-5　蛋白质净电荷与 PH 关系

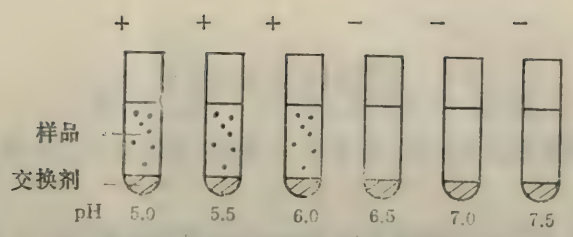


图 2-6 试管方法选择离子交换剂的条件

(2) 离子交换剂处理：Sephadex 用前需溶胀，在室温需 1—2 天浸泡或在 pH = 7 热水浴中2小时，不要用太浓酸碱处理，一般用0.1mol/L HCl，0.1mol/L NaOH纤维素用0.5 mol/L HCl，0.5mol/L NaOH 处理。交换剂需平衡，一直平衡到与洗脱液的pH，电导一样。

(3) 上样量：其量与体积无关，要不大于 10—20% 的交换量。

(4) 改变缓冲液 pH，离子强度进行洗脱。

(三) 应用

离子交换层析是生物化学很重要的分离纯化技术，可分离蛋白质、酶、激素、核酸等等，还可以浓缩样品。

三、亲 和 层 析

亲和层析：根据生物大分子的生物功能及专一的化学结构进行生物大分子的分离纯化，此技术发展很快。几乎用于生物活性物质提纯分离的每个实验室。亲和层析是吸附层析的一种类型，固相载体上偶联上配基，如果大分子与配基之间有专一的吸附及解吸附作用，于是可达到分离目的。生物大分子具有和某些相对应的专一分子可逆结合的特性。如酶的活性中心或别构中心能和专一的底物、抑制剂、辅助因子和效应剂通过某些次级键相结合，抗体与抗原，激素及其受体，核糖核酸及其互补的脱氧核糖核酸等，在一定条件下又可以解离。

亲和层析的基本过程：1)偶联：将欲分离大分子 S 的配基 L 在不影响其生物功能情况下与水不溶性固相载体结合（称为固定化），制成亲和吸附剂或免疫吸附剂。2) 装柱：在层析柱内装入固定化的配基——亲和吸附剂。3) 亲和吸附：上样。只有与配基结合的物质 S 被吸附，杂质流出。4)洗脱：改变洗脱条件，使被吸附物质 S 解离出，得纯化的活性物质。5) 再生：将层析柱充分洗脱再生。亲和层析可以用来纯化各种酶、抗体、抗原、维生素结合蛋白、传递蛋白、激素和药物的受体，核酸。常用的固相载体是琼脂糖凝胶（Sepharose 4B）其吸附容量比较大，所用配基必须对欲纯化的大分子有很高的亲和力，如鸡蛋清的卵类粘蛋白是胰蛋白酶的天然抑制剂，将它偶联到Sepharose4B 上，在 pH 7—8 时此亲和吸附剂与胰蛋白酶有专一结合，而在 pH2—3 时又重新解离，从而使胰蛋白酶纯化。瑞典 Pharmacia Fine Chemicals 于 1972 年研制用溴化氰活化 Sep-harose 4B 载体、活化载体可很容易地偶联上含一级胺基蛋白质。该公司还有其他活化载体生产、AH-Sepharose，CH-Sepharose 4B 活化载体偶联带羧基、糖分子，Epoxy-activatedSepharose 6B 偶联含胺、硫醇、羧基的分子。

四、低压柱层析装置

低压柱层析成套装置是由层析柱、检测仪、收集器、蠕动泵及记录器等部分组成，根据不同的用途组合配套。

国产紫外检测仪主要有：8701 或 HD-86-5 Al 型核酸蛋白检测仪（浙江省永嘉 永临机电仪器厂）；HD-81-5 核酸蛋白检测仪，XZ-85-1 型核酸蛋白检测仪（温州市鹿城生化仪器制造厂）HD-76-6 型核酸蛋白质检测仪（上海），ZW-1 型紫外检测仪（北京）。国产检测仪由电源、检测仪、记录仪三部分构成。它能检测 260 纳米波长 280 纳米波长。

恒流泵主要厂商有：

HL-1 恒流泵（上海市沪西仪器厂）

80 型通用蠕动泵（江苏电分析仪器厂）

部分收集器厂商主要有：BS-型自动部分收集器 160 型和 100 型（圆 盘式），SJ-1 自动收集器（长方型）（上海沪西机电厂）。

色谱柱主要厂商有：各种规格色谱柱（上海锦华实验器械厂）：2型系列层析柱（内径10毫米，16毫米，26毫米，长度20—100厘米）、及转换接头。

梯度仪厂商：XT-1 型梯度仪（上海科华生化试剂实验所）。

国外瑞典 Pharmacia-LKB公司供应全套组合式的低压柱层析装置。可根据不同用途组合配套。该公司提供凝胶过滤（Sephadex® 葡聚糖凝胶），亲和色谱（溴化氰活化的Sepharose® 琼脂糖 4B），色谱聚焦（多元缓冲剂），整套 FPLC（快速蛋白、多肽、多核苷酸液相色谱系统），高效色谱系统。FPLC 系统部件包括 GP-250 梯度程序器，LCC 液相色谱 控 制器，P-500 高精度泵，pH 检测器，UV-1 单通道紫外检测器，FRAC-100 部分收集器，REC-481单笔记录仪，REC-482 双笔记录仪，P-1 型蠕动泵，10ml、50ml 超容量环，Mono Beads耐压和对 pH 稳定的色谱吸附剂，Polyanion SI 预装柱内装弱阴离子交换 剂，HR10/10 柱，RPC 反相色谱填料。

LKB 公司提供积木式低压色谱系统：2152 液相色谱控制器，蠕动泵：Microperpexs，组分收集器：SuperRac，UltroRac，HeliRac，RediRac，检测器：紫外 UV S，UV SD，UV Sll，pH 离子检测器。

美国 Amicon. Grace 公司（亚米康及基利士）提供实验室及工业生产线上使用大小型物质分离、提浓和纯化设备与色谱柱以及完整色谱系统，亲和式、过滤、脱盐及离子交换凝胶、正相和反相硅胶。

第三章　高效液相色谱仪

谢光华

一、原　　理

液相色谱是用液体作流动相的色谱技术。其分离原理同气相色谱法，即利用不同物质在固定相与流动相之间具有不同的分配系数（或溶解度），当流动相带着被分离物质在装填在色谱柱内的固定相之间穿行时，这些物质在两相之间重复地进行分配，利用分配系数的差异，逐步地将不同组分物质分离开来，以致达到完全的分离。

色谱柱内的填料是固定不动的，叫作固定相，作为洗脱液的溶液或有机溶剂是流动的，叫作流动相。经典的液相色谱也叫柱色谱或柱层析，即在一定口径的玻璃管内填装硅胶或 Sephadex（葡聚糖凝胶），溶剂靠重力自上而下流动，所以流速较慢，分离效率不高，完成一次分离，往往需要几小时、甚至几十小时。到本世纪 60 年代末，由于 10 微米左右微粒填充剂，以及高压输液泵的出现，大大提高了分离效率，加快了分析时间，使液相柱色谱法发展为一项高效、快速、灵敏的分离分析方法，称为高效液相色谱法（简称 HPLC）。

由于高效液相色谱柱填料的品种齐全，流动相的变化多样，已经广泛地用于生化、医药、临床、环保、食品、农药、石油和化工等领域。尤其是生化样品，一般比较复杂，且要保持其生物活性。高效液相色谱法正好能够满足生化样品的分离和纯化，以及制备的要求。

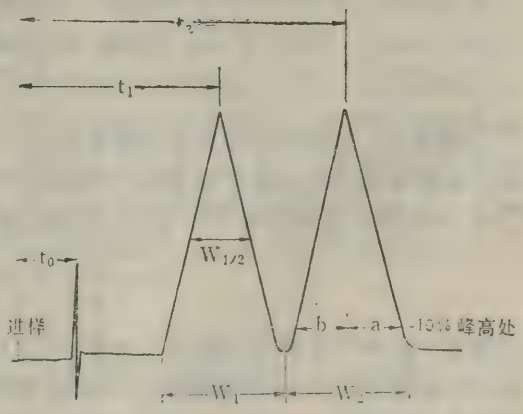


图 3-1　色谱流出曲线

图 3-1 为色谱流出曲线，即色谱图。假设在色谱柱的顶部注入 1、2 两个样品，它们随流动相进入柱内后，与固定相之间有吸附分配作用，其相应的流出时间分别为 t_1 和 t_2，叫作保留时间。如果某物质在色谱柱内与固定相无任何吸附分配的物理作用，则该物质直接穿过固定相微粒之间的空隙，它的流速就是流动相的流速，得到的即为无保留物质的色谱峰，相应的流出时间即为无保留时间 t_0，可以得到：

$$k_1' = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$

$$k_2' = \frac{t_2 - t_0}{t_0}$$

容量因子 k' 又称容量比、分配容量，定义为样品组分在固定相和流动相两者分配量之比，是衡量色谱柱对被分离组分保留能力的重要参数。

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

选择性 α 反映了固定相对样品 1、2 亲合度的不同，由色谱峰的相对位置决定，α 值大，说明固定相的选择性好。

$$N = 16\left(\frac{t_1}{W_1}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_1}{W_{1/2}}\right)^2$$

W_1 是样品 1 的基线宽度，$W_{1/2}$ 是样品 1 的半峰宽度、N 为理论塔板数，也叫色谱柱效，即以色谱峰的区带宽度来衡量色谱柱效能，N 越大，柱效越高。

$$H = \frac{L}{N}$$

L 为柱长，H 是理论塔板高度。H 越小，柱效越高，说明样品组分在两相间达到分配吸附平衡的次数越多，获得的色谱峰半宽度 $W_{1/2}$ 越窄，对样品的分离能力就越大。

$$h = \frac{H}{d_p}$$

d_p 固定相颗粒的名义直径，h 是折合板高，用来衡量由固定相颗粒大小所引起的色谱峰展宽的程度。h 是无因次量，故适合对不同的色谱柱进行比较，一根好的色谱柱，h 应在 2—3.5 之间。

$$A_{10} = \frac{a}{b}$$

A_{10} 表示峰对称性，即在色谱峰高度的 10% 处计算（见图 3-1）。对称的色谱峰 $A_{10} = 1.0$，一根好的色谱柱，A_{10} 应在 0.85—1.30 之间。

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(W_2 - W_1)}$$

R_s 是分离度，为色谱柱的总分离效能指标。它说明色谱柱对两种物质分离的效能，因而可以定量地描述混合物中相邻两个样品组分在色谱柱内的分离情况。分离度与理论塔板数 N，选择性 α 及容量因子 k' 之间的关系，如下表示式：

$$R_s = \frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'}{k' + 1}\right)$$

改变其中任何一项都可以提高分辨率（即分离度）。在色谱分离过程中，分离速度、分离度和柱容量三者之间是互相制约的，例如要得到好的分离度，需减小样品量或降低流速，一般说来，既要提高分离度，又要兼顾分离速度。选择合适的流动相可以改进样品分离的 α 值，增加色谱柱长度和减小固定相颗粒直径可提高柱效，改变流动相组分比例以调节 k' 值，所有这些需要进行综合考虑。

二、仪　　器

高效液相色谱仪器系统如图 3-2 所示。包括高压输液泵，进样阀、色谱柱、检测器和记录器（或微处理机）。重要的附件有梯度洗脱装置，馏分收集器等同主机联用可扩展其性能应用范围，现就仪器各组件的结构功能分述于下。

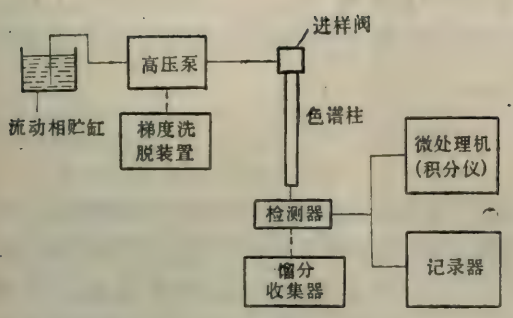


图 3-2　液相色谱仪系统

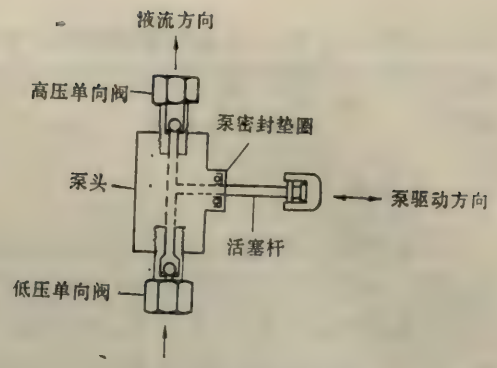


图 3-3　往复式柱塞泵

(一) 高压输液泵

其功能是把贮液容器内的溶剂(即流动相)以高压送入液路系统。对高压泵有几个具体要求：1) 能在高压下长期稳定地工作，最高工作压力不低于 400 公斤／厘米^2。2)能提供无脉动的恒定流量，对于分析型仪器的流量范围一般在 0.1—9.9 毫升／分，对制备型仪器的流量可达 50 毫升／分。3) 流量精度和重复性应控制在 0.5% 以内。4) 耐腐蚀，便于更换溶剂和做梯度洗脱。5) 维修和更换另件方便。

高压泵有几种形式：往复式柱塞泵，气动放大泵，隔膜泵和注射泵。目前最常用的是往复式柱塞泵 (图 3-3)，主要优点是液缸体积小，更换溶剂十分方便，这是很重要的，因为在寻找分离条件时需要经常变换溶剂的组成，泵的流量输出与步进电机的转速有关，柱塞的来回冲程靠电机带动，所以改变电机转速即可调节流量。柱塞和上、下两个单向阀的球座都是宝石材料制造的，耐磨抗腐蚀，使液体按规定的方向流动。要求作为流动相的液体内无悬浮物，否则影响单向阀和柱塞垫圈的密封。为此流动相使用前要过滤，若含无机盐则浓度不能太高，以免析出。为了满足工业规模制备生化物质，常采用大型隔膜泵，由柱塞带动金属(或聚四氟乙烯材料)的隔膜来回移动，其频率约 300 次／分 藉此输送流动相，其优点是流量大 (500—1 000 毫升／分)、抗腐蚀、无污染。过去一直采用 316 不锈钢作为泵体材料，但不能满足生化分析和制备的要求，主要是不锈钢不耐盐、易锈 蚀。近年来已经改用钛金属或全四氟乙烯为泵体材料(如LKB 和 Bio-Rad 公司生产的高压泵)。

(二) 进样阀

即高压六通进样阀 (图 3-4)，有很多优点，如密封性、重现性都很好，死体积小，在高

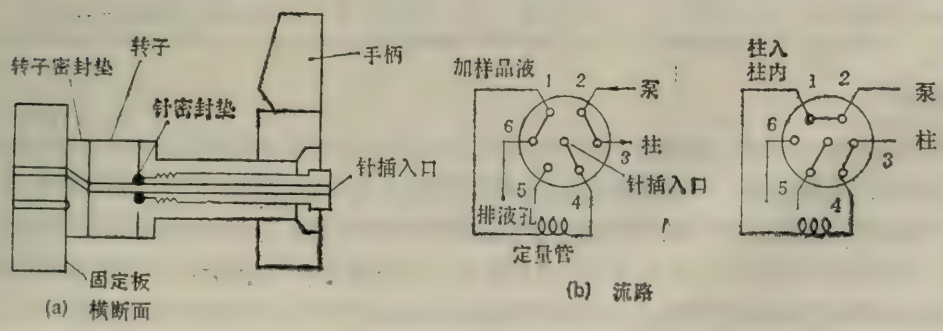


图 3-4　高压六通进样阀

压下能可靠地工作。进样阀的定量管有10、20和50微升等，通过微量注射针注入样品液。如需用于制备，则定量管体积可达0.5—2毫升，或通过准确的计量泵注入定量的样品体积。

（三）色谱柱

色谱柱是色谱仪的“心脏”部分，借以实现样品混合物组分的分离，大多数是直管形的，材料一般采用内表面抛光的不锈钢管或硬质玻璃管，按照不同的用途有不同的内径，分析型色谱柱内径为1—5毫米，半制备柱内径为6—10毫米，制备柱内径是20—75毫米，工业制备柱内径可达500毫米。色谱柱填料有很多品种，根据分离对象的不同可选择吸附色谱、反相色谱、疏水相互作用色谱、离子交换色谱、亲和色谱和分子排阻色谱等填料，其颗粒大小也有5、10、20—40、30—50微米的区别，对生物大分子（如蛋白质）的分离还要求填料的表面孔径大于300埃（Å）等等。兹择要列于表3-1至表3-4。

表3-1　疏水相互作用色谱固定相

品　　名	表面基团	粒径（微米）	孔径（Å）	生产厂
Ultrapore RPSC	C_3	5	300	Beckman
Spherogel TSK Phenyl-5PW	苯基	5	1 000	
Butyl-G3000SW	C_4	10	250	东洋曹达
Phenyl-G3000SW	苯基	10	250	
Matrex Silica-C8	C_8	10	250	Amicon
Bio-Gel TSK-RP	苯基	10	1 000	Bio-Rad
Hi-Pore RP-304	C_4	5	330	
Hi-Pore RP-318	C_{18}	5	330	
Protesil-300-C8	C_8	10	300	Whatman
Synchro Pak RP-butyl	C_4	6	300	Synchrom
Phenyl-Sepharose CL-4B	苯基			Pharmacia
Octyl-Sepharose CL-4B	C_8			
Vydac 219TP	苯基	5,10	300	The Separations
Vydac 208TP-C8	C_8	5,10	330	Group
Vydac 214TP-C4	C_4	5,10	330	

（四）检测器

样品组分从色谱柱内被顺序洗出，由检测器按其物理或化学的特性显示并转换为电讯号以进行定性和定量。对检测器有几点具体要求：1）对所有样品都有响应（称通用型），对某些样品有响应（称选择型），但是对流动相不应有响应。检测器对样品的响应值在一定范围内应呈线性。2）灵敏度高，通用性强。3）对温度及流量的波动不敏感。4）死体积小，不增加色谱峰的扩展。5）不破坏样品组分。6）对样品的定性能提供某些结构信息。7）使用维护方便，价格便宜。

表3-2 离子交换色谱柱

品名	粒径（微米）	内径（毫米）	柱长（毫米）	生产厂
阴离子交换柱				
Spherogel TSK DEAE-2SW	5	4.6	250	Beckman
Spherogel TSK DEAE-3SW	10	6.0	150	
Spherogel TSK DEAE-3SW	10	21.5	150	
Bio-Gel TSK DEAE-5PW	10	7.5	75	Bio-Rad
Bio-Gel TSK DEAE-5PW	10	21.5	150	
Bio-Gel TSK DEAE-5PW	10	55.0	200	
TSK gel QAE-2SW	5	4.6	250	东洋曹达
TSK gel DEAE-2SW	5	4.6	250	
TSK gel DEAE-3SW	10	21.5	75	
TSK gel DEAE-3SW	10	21.5	150	
TSK gel DEAE-5PW	10	7.5	75	
TSK gel DEAE-5PW	13	21.5	150	
Shodex AX pak N-422	9	4.0	250	昭和电工
Shodex AX pak U-424	10	4.6	250	
Shodex IC I-613	6	6.0	150	
Mono Q	10			Pharmacia
阳离子交换柱				
Spherogel TSK CM-2SW	5	4.6	250	Beckman
Spherogel TSK CM-3SW	10	6.0	150	
Spherogel TSK CM-3SW	10	21.5	150	
Bio-Gel TSK SP-5PW		7.5	75	Bio-Rad
		21.5	150	
		55	200	
TSK CM-2SW	5	4.6	250	东洋曹达
TSK CM-3SW	10	4.6	250	
Shodex Ionpak C-811	10	8.0	500	昭和电工
Shodex SUGAR SC-1211	7	6.0	250	
Shodex SUGAR SZ-5532	6	6.0	150	
Mono S	10			Pharmacia
MAPS ABCM		25	100	Bio-Rad

检测器内一般都有流动池，流动池的体积大小按用途区分，分析型的为8—10微升。制备型可以是几十微升。高效液相色谱的各种检测器都有其一定的适用范围，在选用时应尽量扬长避短，充分发挥其效益。

1. 紫外吸收检测器 是目前液相色谱中最常用的一种检测器，大约70%的样品可用紫外检测器，其主要优点是：灵敏度高，线性范围宽（约10^4），对流动相流速和温

表3-3 亲和色谱柱

品名	配基	柱尺寸（毫米）	粒径（微米）	用途	生产厂
AF-894	Acryflavine	8×50	15—20	RNA，DNA，维生素	昭和电工
PB-895	Aminophenyl boronic acid	8×50	15—20	核酸，儿茶酚胺	
BA-494	牛血清白蛋白	4.6×150	15—20	光学异构体	
BA-894L	牛血清白蛋白	8×50	15—20	光学异构体	
CB-894	Cibacron Blue F3G-A	8×150	15—20	白蛋白与NAD有关的酶	
CA-894	ConcanavalinA	8×50	15—20	糖蛋白，寡糖	
IA-894	亚氨基二乙酸	8×50	15—20	干扰素，血清蛋白	
HR-894	肝素	8×50	15—20	凝血因子，脂蛋白	
PA-894	蛋白A	8×50	15—20	IgG，IgM，抗原-抗体络合物	
Affi-prep10	N-羟基琥珀酰亚胺活性酯	4.6×30		IgG	Bio-Rad
Affi-prep protein A	蛋白A	4.6×30		IgG	
Ultraffinity-EP	Procainamide	4.6×50	10	乙酰胆碱酯酶	Beckman
	兔 IgG	4.6×50	10	兔抗BSA	
	Aminospiroperidiol	4.6×50	10	多巴胺受体	
Dye-Matrex, PBA		4.6×150	10		Amicon
Arginine-Sepharose 4B	精氨酸			丝氨酸蛋白酶	Pharmacia
Protein A-Sepharose CL-4B	蛋白A			IgG	
Heparin-Sepharose CL-6B	肝素			脂蛋白，脂酶等	
Con A-Sepha-rose	Con A			糖蛋白，膜蛋白，糖脂等	

度的变化不敏感，并适合梯度洗脱。其中又可分为固定波长紫外检测器（图3-5）和可变

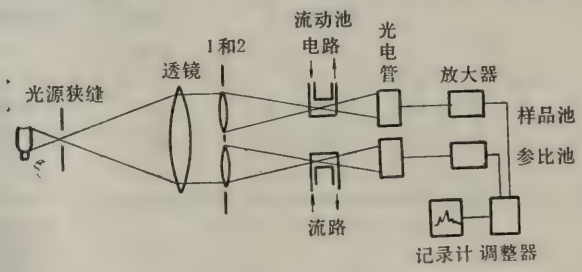


图3-5 固定波长紫外检测器

波长紫外检测器（图3-6）。固定波长有214、254和280纳米（nm）等，其中以254纳米最普遍。常用的光源有锌灯（214nm）和低压汞灯（254nm），大多数有紫外吸收的样品在254纳米处都有灵敏吸收。使用紫外检测器时，所用溶剂不应在测定波长有吸收，作梯度洗脱时更是是如此，否则将会使背景提高和引起基线漂移。溶剂应事先脱气，以免气泡通过流动池出现很大的干扰讯号。可变波长紫外检测器使用的波长范围是：190—370纳

表 3-4 分子排阻（凝胶过滤）色谱柱

品名	排阻极限	内径（毫米）	柱长（毫米）	生产厂
Spherogel TSK 2 000SW	70 000	7.5	300	Beckman
Spherogel TSK 2 000SW	70 000	7.5	600	
Spherogel TSK 3 000SW	300 000	7.5	300	
Spherogel TSK 3 000SW	300 000	7.5	600	
Spherogel TSK 4 000SW	1 000 000	7.5	100	
Spherogel TSK 1 000PW		7.5	300	
Spherogel TSK 2 000PW		7.5	300	
Spherogel TSK 3 000PW		7.5	300	
Spherogel TSK 4 000PW		7 5	300	
Spherogel TSK 5 000PW		7.5	300	
TSK gel G 2 000SW	100 000	7.5	600	东洋曹达
TSK gel G 3 000SW	500 000	7.5	600	
TSK gel G 4 000SW	7 000 000	7.5	600	
TSK gel G 2 000PW		21.5	600	
TSK gel G 3 000PW		21.5	600	
TSK gel G 4 000PW		21.5	600	
TSK gel G 5 000PW		21.5	600	
TSK gel G 6 000PW		21.5	600	
Shodex Ionpak S-800	500 000	8.0	500	昭和电工
Shodex Ionpak KS-800	10 000	8.0	300	
Shodex Protein WS-802.5	50 000	8.0	500	
Shodex Protein WS-803	150 000	8.0	300	
PROTEIN-PAK 60	20 000			Waters
PROTEIN-PAK 125	80 000			
PROTEIN-PAK 300SW	500 000			
Superose 12 HR 10/30	300 000			Pharmacia
Superose 6 HR 10/30	1 000 000			
日立Gel Pack GL-W530	50 000	10.7	300	日立
日立Gel Pack GL-W550	2 000 000	10.7	300	
日立Gel Pack GL-C630	20 000	10.7	300	
日立Gel Pack GL-C650	500 000	10.7	300	

米，扩展了检测器的使用，它是用氘灯作光源，经光栅分光，自动扫描。但经分光后的单色光强度减弱，其灵敏度比固定波长检测器低些。当样品组分通过流动池时，可以停流扫描，获得样品的紫外光谱，为样品的定性提供佐证。因为物质有紫外吸收方能被检测，所以它是一种选择性检测器。

2. 示差折光检测器 利用样品与流动相之间折光指数之差进行检测，每种有机物都有一定的折光指数，所以它是一个通用型检测器，尽管灵敏度较低，但对没有紫外吸收的物质，如糖类、脂肪和类固醇化合物等能够检测，故对某些生化样品仍不失为一种重要

的检测器，尤其适合样品量较大的制备色谱。图 3-7a 和 3-7b 分别为反射式和偏转式示差折光检测器。反射式光轴调整较难，但流动池体积小，耐压性好。偏转式光轴调整容易，灵敏度高，但流动池耐压性差（不大于 5 千克／厘米^2）。

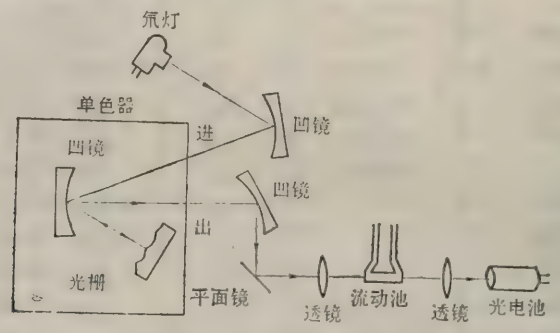


图 3-3　可变波长紫外检测器

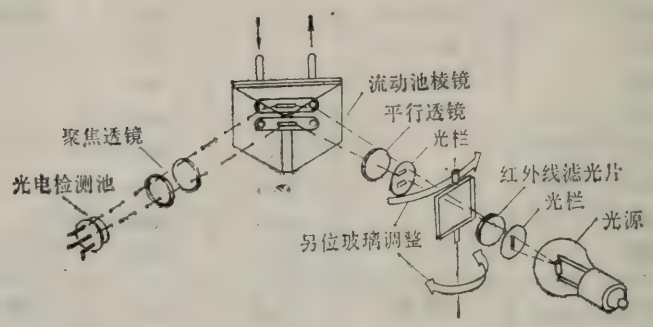


图 3-7a　反射式示差折光检测器(LDC公司，1103型)

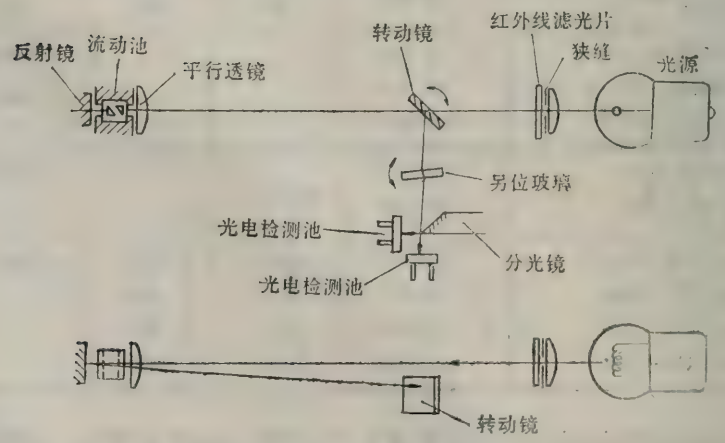


图 3-7b　偏转式示差折光检测器(岛津RIO-2A)

示差折光检测器的缺点是流动池一经污染不易洗净，对温度和流量的变化较敏感，而且不能做梯度洗脱。

3. 荧光检测器　物质分子受光照射后，其中某些电子由原来的基态跃迁到第一电子激发态或更高电子激发态的各个能级，当它们由第一电子激发态回到基态的任何能级时，激发分子以光的形式放出它们所吸收的能量，这就是荧光。如果样品的分子结构中有

发荧光的基团，通过波长较短的激发光（叫激发波长），使样品受激，发射出波长较长的发射光（叫发射波长），若对激发光和发射光进行扫描，即得到该样品的荧光光谱。

能发荧光的物质仅是少数，而另一些化合物则可以采用化学衍生法生成具有强荧光的衍生物。丹磺酰氯、荧光胺和邻苯二醛都是衍生物试剂，可以与氨基酸及生物胺反应生成荧光衍生物，灵敏度很高。一般采用自动扫描的荧光分光光度计（图 3-8）作为这种高灵敏的选择性检测器，由光源（氙弧灯）发出的连续光，经过光学系统聚焦和单色器变成单色激发光，当样品池内有发荧光的分子时，发出的荧光再经过光学系统被接收下来。

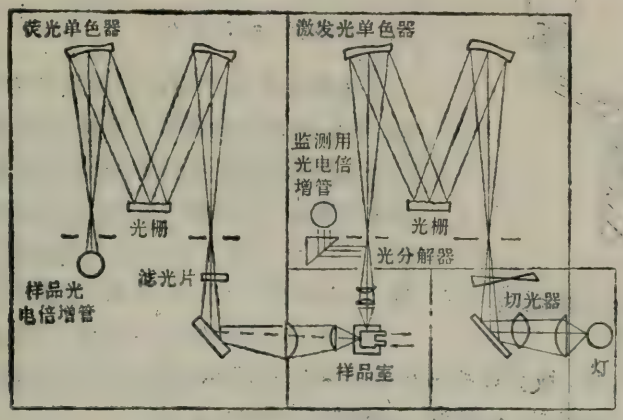


图 3-8　荧光分光检测器（日立 MPF-4）

4. 光电二极管阵列检测器　由许多个光电二极管排列在接收板上，它们并联工作，同时检测由光栅分光，入射到接收板上的全部波长光讯号，然后由移位贮存器依次将光讯号转变为电讯号输出。它的光学系统如图 3-9 所示，辐射光经聚焦后透过流动池，然后由光栅分光入射到线性光电二极管阵列接收板上。光闸可以改变位置作为校正和补偿暗电流之用。

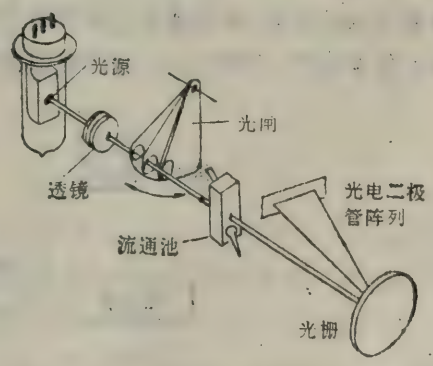


图 3-9　光电二极管阵列检测器的光路（LDC）

光电二极管阵列检测器采用多通道技术同时检测所有波长的光谱，扫描速度极快，由微机控制仅需 10 毫秒即可获得完整的光谱图。这就不必停流扫描，在色谱流出过程中即可从谱峰的任一点采样扫描，得到该点的样品谱图。还可以把谱图信息输入计算机的存贮器内，需要时也可把标准样品的谱图资料从计算机中调出作为对照。光电二极管阵列检测器有以下特点：1）能同时在 4—8 个波长下检测，还可进行复杂样品的多组分检测（多波长色谱图）。2）能给出波长-时间-吸收度的三维色谱图。3）能把未知样品的光谱图与计算机贮存的标准物光谱图同时显示在计算机显示器的屏幕上，以获得未知样品的定性数据。4）改进了信噪比，降低了样品的检出限量。

5. 电化学检测器　电化学检测器具有灵敏度高、线性范围宽和死体积小等优点，且可对混合物中的痕量电活性物质进行选择性检测。其中，安培检测器是近年使用最多

的一种检测器（图 3-10），关键部件是固体工作电极，如碳糊、玻碳或铂电极等，可以检测氧化和还原的化合物，如儿茶酚胺，药物代谢物和某些生物活性物质。常用的参比电极是银／氯化银电极。固体电极可以做得很小，结构简单，灵敏度高。缺点是由于被测定物质的氧化和还原作用而沉积在电极表面，故测定前需要对电极表面进行抛光，这样，重复性较差。

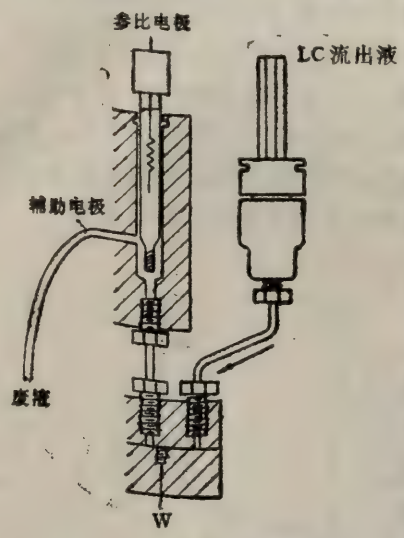


图 3-10　固体电极安培检测器
(BAS Co.)

（五）记录器（或积分仪）

常用的是电子电位差计式的笔式记录器，简单可靠，可直接画出色谱图。也可使用积分仪，除给出色谱图外，还可计算色谱峰面积和在色谱峰边上直接打出保留时间。利用微处理机实现数据处理自动化，大大提高了工作效率。微处理机具备色谱峰和保留时间的测定，峰面积计算，基线校正，未完全分离塔界峰各组分的百分数，色谱组分的定量计算，数据的自动化处理及贮存等功能。此外，微处理机还可兼作梯度洗脱控制、自动进样和进行人机对话，以给出最佳的色谱工作参数等，称作新一代的智能色谱仪。

（六）梯度洗脱装置

高效液相色谱的梯度洗脱是为了改善分离度、提高峰容量和缩短分析时间，其具体做法是在洗脱过程中改变流动相的组成和比例。梯度洗脱装置又分为低压和高压两种。低压梯度又叫外梯度，即在常压下两种或三种溶剂按不同比例和时间定量混合，然后由高压泵送入色谱柱内，如图 3-11，两种溶剂通过比例阀开闭的时间不同，控制它们的比例。这种

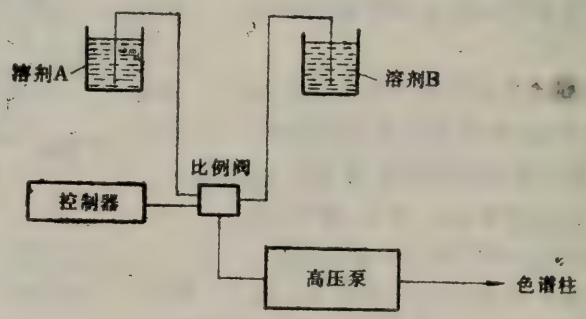


图 3-11　梯度洗脱装置

装置结构简单，只需要一台高压泵。梯度曲线的形状可按需要（图 3-12）由计算机控制，还可扩展到3种、甚至 4 种溶剂。高压梯度又叫内梯度，用两台高压泵分别输送两种溶剂在高压下混合后，再输入色谱柱。这样需要两台高压泵，提高了成本。

（七）分部收集器

分部收集器的作用是分段收集从色谱柱流出的级分。机械式的分部收集器是利用定

时器控制排列在接受盘上的玻璃管定时通过色谱仪出口，把色谱组分分段地收集下来。

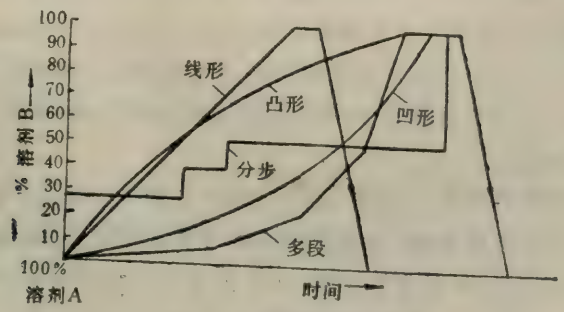


图 3-12　梯度洗脱曲线形状

随着大型制备的需要，多数通过计算机控制色谱峰的切割和分部收集，且可24小时连续操作，为工业规模的分离制备创造了条件。图 3-13 为定时收集各色谱峰分部液的情况，收集区域宽度由计算机操纵。

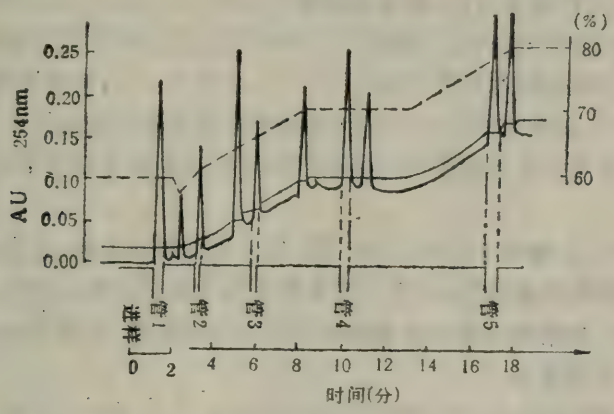


图 3-13　馏分的切割和收集（Gilson 201/202）

三、选购知识

究竟应该怎样订购满意合用的高效液相色谱仪，做到既满足工作需要，又节省资金，这里面确有一定的学问。现在，国内外生产的液相色谱仪都把各部件做成积木式独立的单元，人们可以根据自己的工作需要将这些单元组合起来使用。订购仪器时首先要考虑两点：1）工作的要求。2）产品的质量。例如，对一些研究所和工厂中心实验室，主要做日常的一般性应用的工作，如生化产品的质量控制和常规分析、食品成分的分析和生物制品的检疫等，则可以购买最简单的液相色谱仪组合：高压泵、色谱柱、紫外（或示差折光）检测器和记录仪，组成一套等强度洗脱的液相色谱仪。可以做单一或固定比例流动相的洗脱，手动进样，实现室温下分离分析的目的，这样一套仪器的价格在一万五千美元左右。倘若需要做一些应用基础研究或探索性的工作，如新产品的开发和利用，未知产物的解析和样品的结构分析等，则需要加上梯度洗脱装置，增加一台高压泵和其他检测器（如荧光，电化学检测器），大概要二万五千到三万美元。

生物样品的分析和制备有一定的复杂性，所以需要购买梯度洗脱装置，以改变流动相

的组成和比例，分离复杂的样品混合物，洗脱过程中，pH 值是经常改变的，要求泵和管路系统抗腐蚀，耐酸碱及高盐浓度。有的公司如 Bio-Rad、LKB 等已有钛金属材料制作的高压泵和液路管道，就是为了满足上述使用要求的，近二年来不少公司纷纷推出光电二极管阵列检测器（Diode-Array Detector），可同时检测八个不同波长的光讯号，响应时间快，对样品的定性很有帮助。但并非每项工作都要用到这种检测器，如果化二万多美元买一台，倒不如先买常用急需的部件。

一般的紫外分光检测器可测定 190—360 纳米的紫外吸收样品，但是在 190—210 纳米范围由于溶剂和杂质的末端吸收，使得背景和噪音增加很多，影响测定。所以，如果经常要做末端吸收的样品测定，可以选购美国 LDC 公司 214 纳米（锌灯光源）的紫外检测器，效果较好。

过去人们不太喜欢使用示差折光检测器，原因是灵敏度低，而且不稳定。日本昭和电工(株)生产的 SE-51 型示差折光检测器采取内部电气补偿线路，避免了上述缺点，灵敏度比一般的示差折光检测器高 0.5 至 1 个数量级。

对于专门的分析项目如蛋白质、酶和氨基酸的分析，不必购买专用的氨基酸分析仪或蛋白质分析仪，液相色谱仪还是可以通用的，其中的区别是选用不同的色谱柱和相应的流动相。分析型液相色谱仪的流量范围一般为 0.1—9.9 毫升／分，制备型液相色谱仪的流量从 10—40 毫升／分，有的公司(如 Gilson) 采取更换泵头的办法来扩大流量做到一机二用。所以，订购仪器要从工作实际出发，经济实用，而仪器的使用要求则是结实耐久，不易出故障。

选用通用型的个人计算机（Apple, IBM 等）作为梯度程序控制、数据处理和操作条件的选择等，比专用计算机价廉合用，软件的开发和利用也比较方便。例如分部收集在生物样品制备中十分重要，利用微机控制色谱峰的切割和分部收集，使得分部收集器具有足够的容量，满足昼夜工作的需要。

订货之前，对外商提供的报价单要仔细研究和比较，各公司产品质量和价格上落很大，而且有的公司在报价单中所列栏目十分庞杂，需要有选择地订购，不能照单全买。因为各公司产品各有所长并非样样都好，有的是高压泵质量好，有的检测器好，有的则提供价兼质高的数据处理系统。国外大部分大学、研究所经常有选择地购买这家公司的主机，另一家公司的部件，结果，一套液相色谱仪是好几家公司的产品凑起来的，这样，充分发挥了诸家之长，使拼搭起来的仪器价格便宜，质量最高。

近几年，用户总是集中订购某一、二家公司的液相色谱仪，除了别的原因外，相互抄袭也是重要的一条。质量、价格和售后服务是我们每个用户必须抓住的关键，不管国外或是国内，谁好就买谁的。

四、验收知识

仪器验收是一项很细致的工作。化了大笔的外汇，理应得到满意合用的产品，仪器验收的目的是检查外商提供的商品是否达到了它的性能指标。一台高效液相色谱仪到货后，首先要组织一个精悍的验收小组，由液相色谱专家、应用技术人员、电气技术人员和器材部门的代表组成。应准备专用的记录本、详细记载验收过程中的原始记录。

表 3-5　国外公司生产的高效液相色谱仪系统

	Isco		Beckman	Waters		Varian	Perkin-Elmer	Gilson	LDC		LKB	Bio-Rad	Kratos	Spectra Physics
紫外可变波长检测器，型号	V4		164	481		2 050	115	116	3 000		2 151	1 305A	773	8 773
有否紫外和可变波长标准	+		+	+		−	+	−	+		+	−	−	+
带宽 6 nm或更好	+		−	+		−	+	−	+		−	−	+	+
噪音2×10^{-5}或更好	+		−	+		−	−	+	+		−	−	+	+
流动池体积(微升)，光程10毫米	7		13	14		8	*	*	14		10	8	*	*
波长可变与否	−		+	−		−	−	+	−		−	−	−	−
氘灯寿命（小时）	8 000		**	**		**	**	1 500	**		**	**	**	**
单泵或双泵输液系统	单泵	双泵	双泵	单泵	双泵	双泵	单泵	双泵	单泵	双泵	双泵	双泵	单泵	单泵
型号	2 350	2 350	114	600	510	2 010	410	303	4 000	3 000	2 150	1 330	400	8 700
流量范围（毫升/分）	0.01—9.99	0.01—9.99	0.01—9.99	0.1—9.9	0.1—9.9	0.1—9.9	0.01—10.0	0.005—5.0	0.01—9.99	0.1—9.99	0.01—5.0	0.1—9.9	0.01—5.0	0.1—9.9
有否制备用的泵头	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	
梯度控制器型号	2 360	Apple IIe 或 IBM-PC	421	600	680	2 020	410	IBM-AT	4 000	1 601	2 152	Apple IIe	430	8 700
控制用计算机型号	Apple IIe 或 IBM-PC	Apple IIe 或 IBM-PC	427	740	740	4 270	LCI-100	IBM-AT	CI-10B	CI-10B	2 220	3 392A	4 270	4 290
是否包括数据贮存磁卡	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
价格	$13 675 $14 895	$14 530 $15 750	$30 000	$22 715	$26 515	$21 790	$21 020	$23 000	$16 665	$19 745	$21 560	$20 145	$19 510	$17 935

整个过程分数量验收、外观检查和质量验收三步。即首先检查货物装箱单上所开列的物件与原订货合同是否相符、核对无误后对主机和各零部件进行外观检查，仪器经过长途运输和装卸，难免有叩碰，如果防震、耐压的包装完善的话，是可以完好无损地到达用户手中的。若发现包装破损，就要注意仪器有否受损，特别对那些精密光学部件和光源有否发生位移和破碎。仪器如无缺损、外观完好、则在仔细阅读使用说明书后即可开始质量(或性能)验收的工作。

高效液相色谱仪的主要部件有高压泵、进样阀、色谱柱、检测器、记录器和梯度装置等。先进行单机检查、然后再联机测试。单机检查是指脱开其他连接部件、单独对某一组件进行检查。然后对整个系统联机测试。

(一) 高压输液泵

主要检查其压力和流量能否达到规定的指标。例如，指标规定该高压泵可达最高压力 500 千克／厘米^2，则在泵出口处接一堵头，观察泵压是否可达 500 千克／厘米^2，系统的所有接头处有否渗漏现象，泵密封垫圈是否可靠地工作。目前，高压泵的流量范围一般为 0.05—9.9 毫升／分，须检查流量精密度和重复性。流量精密度是指在设定流量条件下与实测流量是否相符，方法是用精密量筒和停表测定单位时间的流量，一般，在最低或最高流量条件下容易偏离原设定流量。所谓重复性是指在不同情况下（如空载和不同柱压降）流量的变动。这里要注意的是，大多数泵的压力、流量指标分两档，即流量 5 毫升／分以下最高压力为 500 千克/厘米^2，5—9.9 毫升/分的最高压力为 250 千克/厘米^2，不能要求在高流量条件下达到最高压力。

(二) 检测器

1. 紫外吸收检测器　包括单波长和可变波长两类。需要检查以下几项：

(1) 噪音和漂移：将灵敏度放在最高档程，分别在静态和动态条件下（即没有或有流动相通过检测池）测定基线的噪音和漂移（图 3-14）并同指标比较。

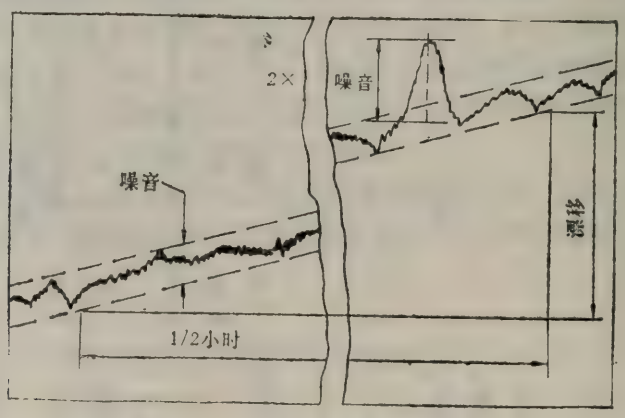


图 3-14　噪音和基线漂移测定

(2) 稳定性：检测器连续工作 12 小时或 24 小时，观察基线噪音和漂移的情况。

(3) 灵敏度自检（以 LDC 公司 1203 单波长紫外检测器为例）：将档程（RANGE）放在0.512 位置，选择开关（ZERO/CHECK），放在 CHECK，记录器应偏转满标的 50%。换

句话说，从电气线路给出 0.268±0.01AU 的偏转值，看记录器指示是否相应偏转满标的50%。

(4) 动态线性范围：随着样品量的改变，检测器有一个线性响应的范围(图3-15)，有的是3个数量级，有的是4个数量级。图中LM间为线性响应范围，L点为最小检测量，是指检测器能够确切地反映出样品的最低极限量，一般取噪音的2倍或3倍(图3-14)。

对可变波长检测器在改变波长时有一个设置精度的问题，故需进行波长精度测定。

(5) 波长精度测定：各种可变波长检测器有不同的检查方法。例如日立200-10型分光检测器利用灯源在656.1纳米光谱线检测。从658纳米开始慢慢向短波长扫描，记录仪应在656.1±0.4纳米范围获得最大读数，如能重复几次即可视为达到了指标要求。

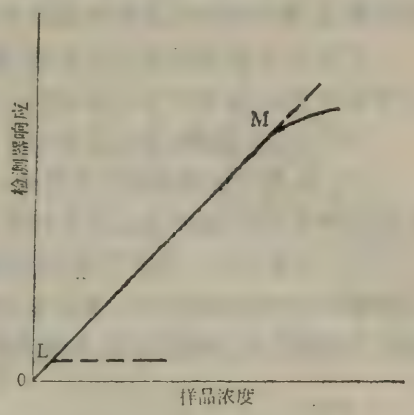


图 3-15 测定检测器的线性响应范围

2. 示差折光检测器 有两种。一种是反射式示差折光检测器(例如LDC公司生产的)，有两个棱镜(折光指数为1.31—1.45和1.40—1.55)，根据所用溶剂和被测样品的折光指数的范围来选择。使用前先要调整跟踪(track)，否则基线无法归零，并有显著的漂移和噪音。跟踪调整方法可参阅说明书。

(1) 基线噪音和漂移：示差折光检测器易受温度的影响，漂移可能会较大，可按指标要求检查。

例如，噪音(在流速1毫升/分或更低时)，

$\pm 1\times10^{-7}$ RIU (水溶液)

$\pm 2\times10^{-7}$ RIU (甲醇)

漂移(在流速1毫升/分或更低时)

a，检测池有温控

5×10^{-7} RIU/时(水溶液)

15×10^{-7} RIU/时(甲醇)

b，检测池有温控

5×10^{-6} RIU/℃(水溶液)

15×10^{-6} RIU/℃(甲醇)

(2) 跨导(span)调整：用来准确刻度示差折光单位(RIU)，以便在记录仪上可直接读出RIU。方法如下：溶解13.33克干燥过的蔗糖于100毫升蒸馏水中。再取出5毫升稀释至1升。该溶液应为10^{-4}RIU。将该溶液注入样品池。测量档程放在16×位置，记录仪应偏移至满标的62.5%，如不够或超过。均可调span电位器至该偏转位置。

另一种是偏转型示差折光检测器，范围较宽，可测折光指数1—1.75，例如日本昭和电工生产的Shodex RI,SE-51，其跨导调整稍有不同，方法如下，溶解220毫克蔗糖于100毫升脱气蒸馏水中，该溶液的折光指数同蒸馏水折光指数之差应为32×10^{-5}RIU，将该溶液注入样品池，参比池保持蒸馏水，测量挡程放在32×位置，记录笔应偏移满标的100%，如不够，可调机体内的span电位器。

动态线性范围和最小检测量并无固定指标，可视需要测定。

3. 荧光检测器 目前多数是光栅自动扫描荧光检测器，其激发波长和发射波长范围为 220—780 纳米。

(1) 检查光栅准确度：如果氙灯作光源，样品池盛满蒸馏水，激发波长 (excitation wavelength) 放在 0 位置，发射波长 (emission wavelength) 在 467 纳米慢慢来回转动发射波长度盘，并注意指示表的读数在最大的位置，此时发射波长应在 467±5 纳米为合适。

反过来，发射波长放在 0 位置，激发波长在 467 纳米附近慢慢来回转动，指示表在最大读数位置处，激发波长应在 467±5 纳米。

如用汞灯作光源，波长应为 436±5 纳米。

(2) 检查已知样品的荧光光谱：用标准样品蒽，配置 0.01 微克/毫升的乙醇溶液，激发波长放在 250 纳米，发射波长扫描得图 3-16。

(3) 定量分析：配置不同浓度的硫酸奎宁 0.1N 硫酸溶液，在激发波长 365 纳米和发射波长 460 纳米条件下，作定量工作曲线 (图 3-17)，检查检测器的线性响应。还可用蒽或丹磺酰化氨基酸测定最小检测量。

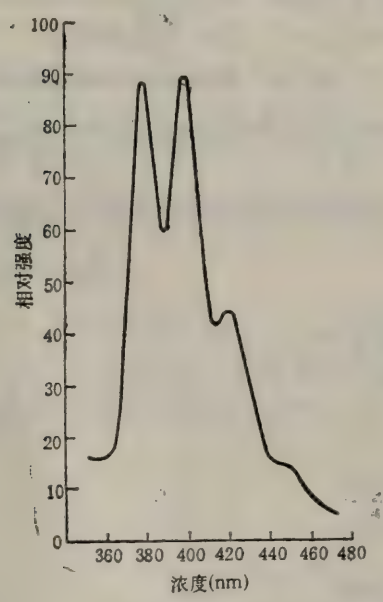


图 3-16 蒽的荧光光谱

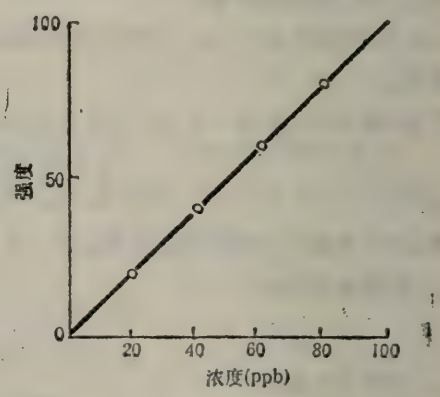


图 3-17 硫酸奎宁工作曲线 E_x 365纳米，E_m460纳米

(三) 进样阀

进口液相色谱仪都采用进样阀进样，其工作压力多数在 150 千克/厘米^2，所以，若较长时间工作在 150千克/厘米^2 以上极易损坏进样阀转子造成漏液。对进样阀主要检查两项指标。

1. 定量准确性 进样阀都有固定体积的定量管 (Loop)。一般是 10 微升和 20 微升，可用微量注射器精确测量定量管的体积。一次进样的绝对量是通过样品液的浓度乘上定量管体积得到的。制备色谱用的进样阀其定量管体积可达 0.5—1 毫升。

2. 重复性 连续几次进样，分别测得检测器的响应值 (以峰高或峰面积表示)，可

算出均方偏差和变异系数。

（四）色谱柱

色谱柱是液相色谱仪的重要组件，在运输过程中由于振动或柱内溶剂挥发导致柱效下降、柱分离效能变差，因此，需要检查几个指标。

1．柱效　选择一个纯净的已知样品和合适的流动相，得到样品的保留体积和半峰宽（也可取峰底宽），如图3-18所示。例如，tr = 481.2秒

$W_{1/2}$ = 13.2 秒，按下式

$$N = 5.54\left(\frac{tr}{W_{1/2}}\right)^2$$

N为理论塔板数

$$\therefore\quad N = 5.54\left(\frac{481.2}{13.2}\right)^2 = 7369$$

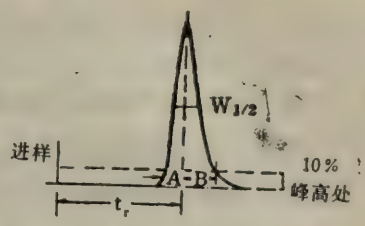


图 3-18　柱效计算和峰不对称性

如色谱柱长为 25 厘米，则理论塔板高度 $H = \frac{L}{N}$

$$\therefore\quad H = \frac{250}{7369}\text{毫米} = 0.034\text{毫米}$$

各种柱子测柱效使用的已知样品和流动相各不一样，如 C_{18} 反相柱可用萘作已知样品，75%甲醇：25%水为流动相。

2．峰不对称性（图3-18）　由峰尖作垂线与底线相交，在峰高10%处截取A和B，然后计算峰对称因子 B/A，一般以 0.8—1.2 为宜。

（五）记录仪

1．灵敏度　有 1、2、5、10、20、50、100、500、1000 毫伏各挡，分别代表满标毫伏数。可用标准电子电位差计分别向记录仪输入上述各毫伏数，视记录笔是否满标偏移。

2．准确度　如指标规定为满标的 0.3%，则向记录仪输入某一毫伏数几次，观察满标响应值的偏差和重复性。

3．记录纸速度　可设定某一记录纸速，如 5 毫米/分，在一定时间内量取走纸长度，与设定纸速比较。还可测定不同时间内记录纸速是否均衡。

（六）梯度洗脱装置

一般，由梯度程序装置控制（图3-19），可作各种形式的梯度洗脱曲线。但由于混合室以及连接管道等死体积的存在，实际的梯度曲线（即流动相组成的变化）总要比理想的滞后一段时间（图 3-20），故应尽量减小死体积和提高溶剂混合的效率。

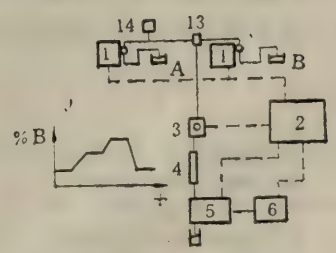


图 3-19　梯度洗脱系统

1．高压泵（A、B两种溶剂），2．梯度程序控制，3．进样阀，4．色谱柱，5．检测器，6．记录仪，13．混合室，14．阻尼器。

图 3-21 表示对系统进行梯度洗脱实验的检查。两种溶剂梯度，A 溶剂为 0.2% 甲苯的甲醇溶液，B 溶剂为甲醇，梯度变化从 0%A 到 10%A（其余为 B），

每分钟变化5%，然后保持3分钟，再恢复到起始状态。

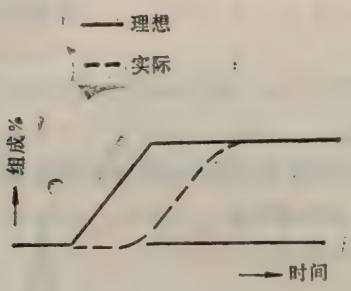


图 3-20 梯度曲线

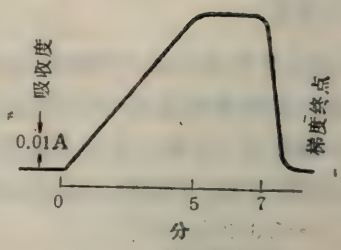


图 3-21 梯度洗脱实验

流速，2毫升/分；UV检测器，260纳米。

很多高效液相色谱仪已由微机控制，在工作前利用微机自检系统进行检查，如无差错则可进行整个仪器的运转检查，这些，可参阅有关说明书，分别按要求进行检查。

五、在生化中的应用

近几年来，由于生物工程的快速发展，如基因工程，酶学方法和单克隆抗体的应用等，现在已经能够通过细胞培养生产人和动物体的蛋白质，这就需要从复杂的混合体系中分离和纯化有关生物活性物质，因为某些杂质的存在会严重影响产品的质量。高效液相色谱作为理想的分离、纯化和制备的手段已为人们普遍接受，尤其对于娇贵的生物活性物质具有高分辨、无破坏性和快速获得纯品等优点。在生物技术中需要利用色谱进行纯化制备的有：人血清清蛋白，静脉内的 γ-球蛋白、抗 Rh 免疫球蛋白，人、牛、猪胰岛素，凝血因子 VIII 和 IX，α、β 和 γ 干扰素，胸腺素，尿激酶，肝炎疫苗和抗原，乳清蛋电，卵清溶菌酶，甲硫氨酰-t RNA 合成酶，酪氨酰-t RNA 合成酶，人生长激素和牛生长激素等等。

针对不同的分离对象，选择有关的分离类型，例如各种蛋白在分子的大小、形状、电荷数、疏水特性，生物亲和性和氨基酸残基的影响等方面各不相同，液相色谱法正是利用了这些差别，分别选择疏水相互作用色谱、离子交换色谱、亲和色谱和分子排阻色谱等，除了分子排阻色谱外，其余的分离类型都同试样混合物和固定相表面之间不同的相互作用有关。

上述色谱分离法都各有所长，如离子交换色谱和疏水相互作用色谱的容量大、回收率高，亲和色谱选择性好和分子排阻色谱（凝胶过滤）通用性强等。利用这些优点，可将各类生化物质进行纯化和制备，其应用范围和生产规模还在不断地扩大。

参 考 文 献

〔1〕H.Engelhardt, Practice of HPLC, Applications, Equipment and Quantitative Analysis, 1983, Springer-Verlag, Berlin.

〔2〕C.K.Lim Ed., HPLC of Small Molecules——A Practical Approach, 1986, IRL Press.

〔3〕F.E.Regnier, Science, 222, 245(1983).

〔4〕G.K.Sofer, *Bio/Technology*, 4, 712(1986).

〔5〕G.Seipke, H.Mulluer and U.Grau *Angew.Chem, Int.Ed. Engl.*, 25, 535(1986).

〔6〕Y.Kato, T.Kitamura, and T.Hashimoto, *J.Chromatogr*, 266, 49(1983).

第四章　氨基酸分析仪

贺宝珍

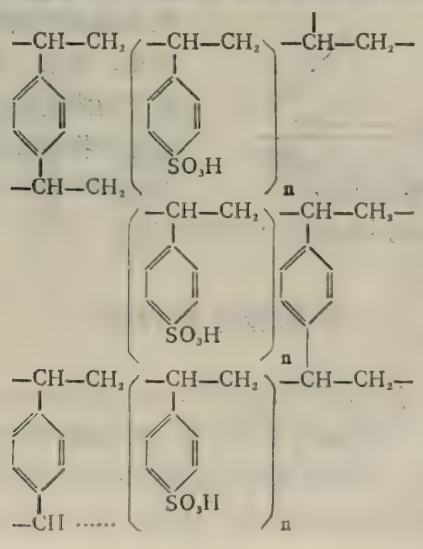
蛋白质是一切生命有机体的物质基础，而蛋白质又是由氨基酸所组成的。生物体除含有组成蛋白质的各种氨基酸外，还有游离存在的各种氨基酸。人们对氨基酸和蛋白质的研究日趋重视，氨基酸分析技术从手工操作发展到使用全自动化仪器，因而分析准确性、灵敏度也大大地提高了，分析时间缩短很多。目前分析一个蛋白质水解样品只需 30 分钟左右，分析一个生理体液样品只需 2 小时左右。拥有仪器的单位日益增多，遍及全国各地，应用范围日益扩大。氨基酸分析仪已成为医学、农业、科研生产单位不可缺少的分析工具。

一、原　　理

1951年 Moore 和 Stein开始用色谱法分析氨基酸。1958年Spackman、Moore和 Stein建立第一台氨基酸分析仪。当时分析时间长，现在仪器应用液相色谱的高压泵、细粒树脂，使得氨基酸分析技术有了突飞猛进的发展，加上最先进的微机处理，成为高速度、高灵敏度高分辨率、全自动的仪器。

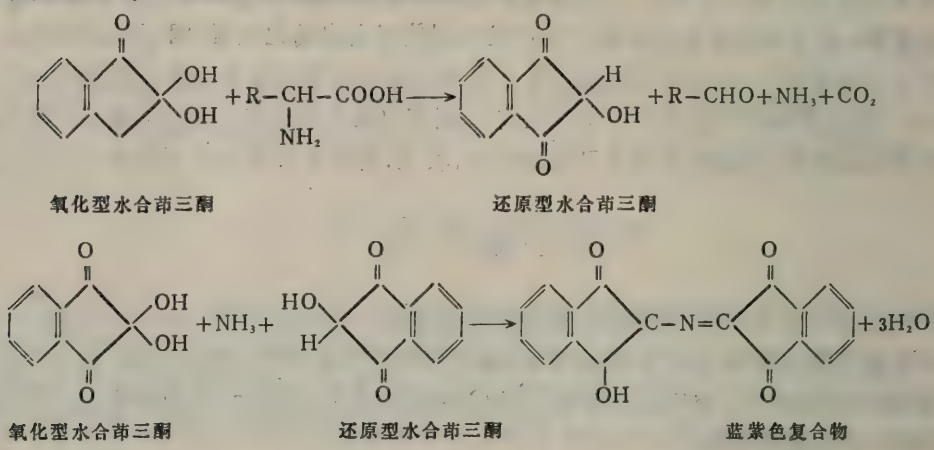
氨基酸因具有不同的酸碱度、极性、分子大小，可用阳离子交换树脂在色谱柱上进行吸附，用不同 pH 和离子强度的缓冲液依次将它们洗脱。酸性氨基酸、羟基氨基酸对阳离子交换树脂的亲合力最弱，就先洗脱下来、中性氨基酸对树脂的亲合力次弱，跟着洗下来，芳香族氨基酸、碱性氨基酸对树脂亲合力更强，因而最后洗下来，洗脱液用茚三酮显色或与荧光试剂起反应，进行定量测定，可计算出氨基酸含量。

色谱柱内填充强酸性阳离子交换树脂，它由苯乙烯及二乙烯苯合成后加以磺化而得，苯乙烯为主要成分，二乙烯苯作为交联剂，磺酸根连在苯环的对位上，其结构如下：



交联结构多少，影响着树脂内部网状结构中孔洞大小。交联剂多，分子结构紧密，洞孔就小，适合于分离分子量较小的离子如氨基酸，一般交链度为8%、12%（树脂内所含二乙烯苯的百分数）。交联剂少，分子结构松，洞孔就大，适合于分离分子量较大的分子，如蛋白质、肽类、最常用交链度为2—4%。目前各国都在研制各厂商自己的树脂，配制方法保密，树脂售价高昂。Moore等最初用于氨基酸分析仪的强酸性阳离子交换树脂Amberlite IR 120，100目。另外美国生产Dowex 50×4、Dowex 50×8，英国生产Zerolit 225，日立2169等。

氨基酸由茚三酮试剂反应检测，其反应式如下：



茚三酮和氨基酸反应产物的吸收光谱见图4-1。呈色产物可在570纳米、440纳米波长检测。茚三酮试剂检测氨基酸是可靠的，但灵敏度相对低。用荧光试剂代替茚三酮试剂，灵敏度可提高10—40倍，荧光胺在溶液中不稳定，它与一级胺反应产生荧光物质，激发波长390纳米，发射波长475纳米。荧光胺来源不易，使用不方便，所以不被广泛地应用。磷苯二甲酸二醛（OPA），在常温下的溶液中是稳定的，灵敏度也高，荧光产物的激发波长340纳米，发射波长455纳米，对于亚胺级氨基酸脯氨酸、羟脯氨酸，要用次氯酸钠试剂氧化后与OPA反应。

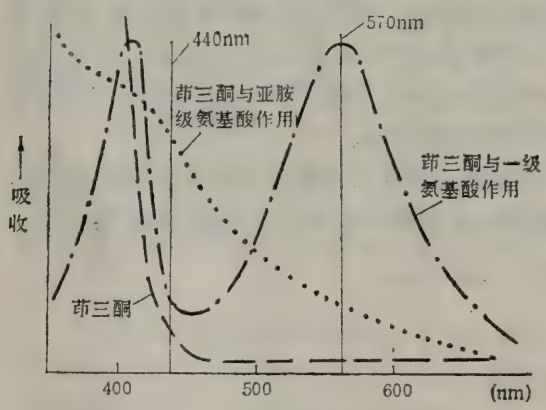


图4-1　茚三酮和氨基酸反应产物的吸收光谱

二、氨基酸分析仪器

氨基酸分析仪器发展很快，很多国家都在生产，但仪器设计的基本原理并未改变，基本结构也一样。现以日立835型氨基酸分析仪为例，表示其流程（见图4-2）。泵以恒定的流量输送缓冲液和茚三酮试剂，自动转换阀用以选择输送溶液的种类，离开柱子后的样品组分，用检测器检测，并用电位计式记录仪绘出色谱图。也可与其他数据处理装置相连。

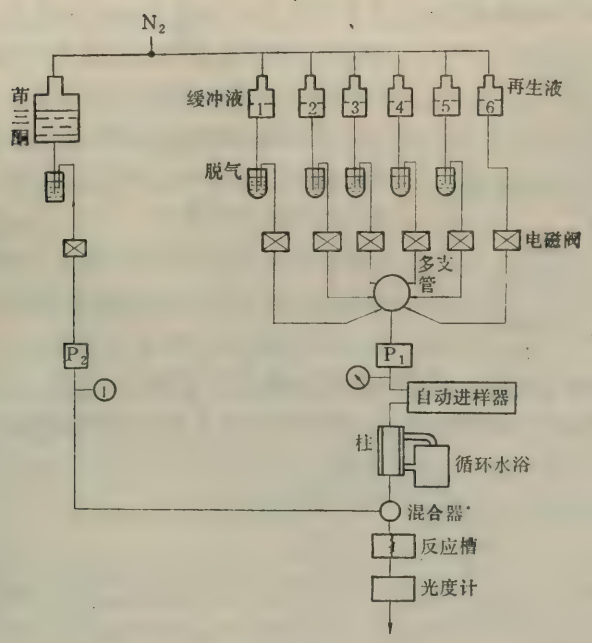


图 4-2　835型高速氨基酸分析仪的流程略图

柱子和反应管应该恒温，以保证能在不同的温度下工作。

（一）氨基酸分析仪的结构

1. 离子交换层析柱　它是仪器的核心，氨基酸的分离是在这里进行的。早先仪器设计是双柱，即碱性柱（短柱）和酸性、中性柱（长柱）。随着细粒度的树脂的使用，仪器采用单柱，内径为 2.6 毫米左右。因而，提高灵敏度，进样量减少，分析时间缩短。

2. 泵　它是氨基酸分析仪的心脏，输送缓冲液和茚三酮试剂在流路系统中流动。用于氨基酸分析仪上的泵主要有三种类型：早先使用复式活塞泵，近期采用柱塞泵或注射筒式泵。柱塞泵其构造如图 4-3 所示。这种泵能够输送连续的，然而是有脉动的液流。可以加设缓冲装置消除这种脉动。

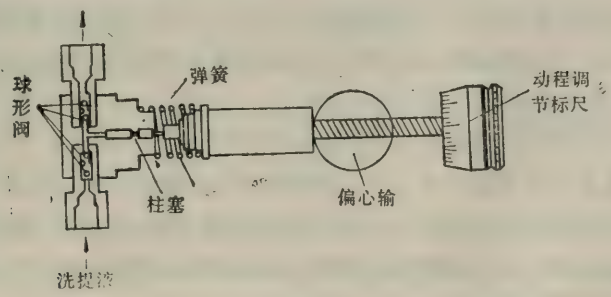


图 4-3　柱塞泵

3. 检测器　常用的是光度计，有的仪器备有灵敏度更高的荧光检测器。氨基酸与茚三酮反应产物在 570 纳米，440 纳米处有最大吸收峰。因此氨基酸分析仪一般用普通光度计。光源最简单的是用钨灯与相应的滤光片而得到单色光，通过流动池，因氨基酸

浓度不同，生成的产物颜色深浅不一，消光度不同。当透过流动池的光照在硒(或硅)光电池上，由光电池把光能转变为电能，以信号(mV)方式送入记录器，被记录下来。

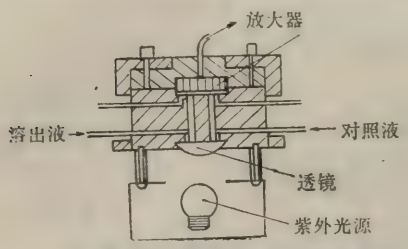


图 4-4　双光束式简易检测器

现在用的光度计多数是双光束，见图 4-4 所示。双光束型的特点使光源的强度变化不影响输出，光源用的电源回路简单。日立 835 型带有光度计。用一波长 700 纳米作参考波长，可同时补偿在 440 纳米及 570 纳米两个波长的测量，使基线稳定。采用凹面光栅色散，见图 4-5 所示。

荧光检测器：其灵敏度高。最简单的荧光检测器的构造，见图 4-6 所示。从光源发出来的光，经过滤光片，照在试样溶液上，从试样溶液发出荧光经滤光片进入受光器。

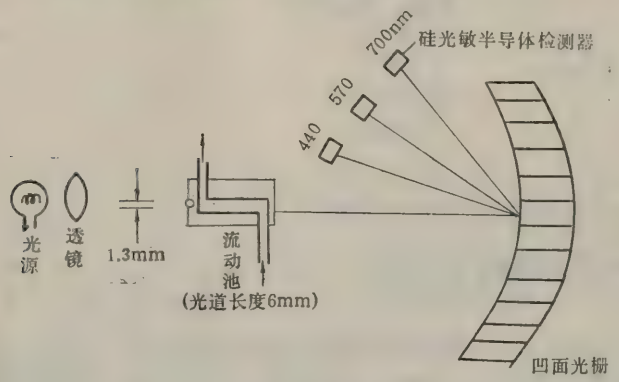


图 4-5　日立835氨基酸分析仪附有光度计光路图

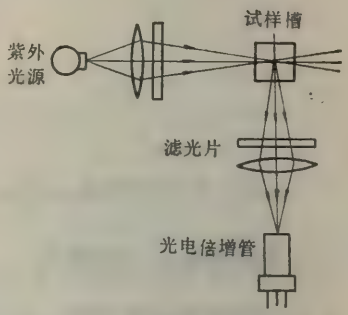


图 4-6　简单的荧光检测器

4. 程序控制器　氨基酸分析仪的自动化，是通过程序控制器来实现的。近期的程序控制器是微型电子计算机式的。如 835 型氨基酸分析仪。把编好的程序输入并贮存于微型电子计算机中，可录在磁卡上。每当仪器工作开始，先把磁卡插入机内，仪器就按规定的程序指令进行分析。若仪器某一部分的状态不符合要求，错误灯就点亮，及时纠正。

5. 数据处理机　氨基酸分析绘出层析图谱，电子计算机可自动地校正基线，自动地收集、贮存和处理数据，并由打印机直接打出样号、分析日期、氨基酸名称、保留时间、峰高、峰面积、数值等。大大提高了分析效率，使氨基酸分析达到了自动化。

(二) 不同型号仪器的性能

目前生产氨基酸分析仪的厂家不少，型号不同，性能也不同，各有其特长，但具有共同点：全自动化，分析柱内径细、分析时间短、试剂用量少，比较经济，仪器灵敏度高，样品用量少。适用于难以制备，尤其是生物提取物。但也存在问题如树脂填充少，易污染，对试剂样品纯度要求高。

1. 日立 L-8500 型　全部用微处理器控制，有屏幕显示，全部控制过程一目了然，仪器部件运转不正常及错误输入都能及时发现，仪器运转用磁带卡片输入，设有两个磁带卡孔，高速度分析因使用 3 微米树脂，标准氨基酸测定 30 分钟，生理体液氨基酸测定 120 分钟，高灵敏度使用茚三酮试剂显色 10pmol，荧光检测 500fmol。分析方式多样化：5 种

阶梯缓冲液洗脱，特殊氨基酸测定，两种不同方法连接（茚三酮试剂显色，荧光检测）。试剂配制说明书都有说明，用户自己配制，这样既方便又便宜。维修仪器方便。峰能正确识别，设有未知样品峰面积比峰高与标准峰面积比峰高之间百分比例。茚三酮试剂用时混合，所以试剂不需要冷却，也不要冰箱保存。柱温加热及反应加热体系是电加热，不用水浴槽，从而体积小，反应温度高。进样量1—100微升，可放108个样品，可以说这种型号仪器在当前是先进的。

2．日立835型　日立835是日立L-8500前一型号，是我国进口氨基酸分析仪最多的一种，是全自动并由微处理器控制全部实验条件，有故障立即停机，带有磁带卡，但只有一个磁带卡孔。样品量50微升，但管道中要消耗200微升，所以不利于生物提取物使用。柱温加热及反应温度都是用水浴槽加热，因而体积大，反应温度比电加热低，反应时间略长。泵是单头微量泵，采用偏心调节，需要手调流量，泵内宝石杆坚硬但易断，价格昂贵。茚三酮试剂检测无荧光检测，试剂需保存在冰箱内。离子交换树脂5微米。分析标准氨基酸需50分钟，生理体液2小时。这类仪器适合大量样品的测定，农业、食品、医院常规分析。

3．端典LKB4400氨基酸分析仪　全自动即可进行无人自动操纵，也可进行手工操纵。数据处理系统可迅速而精确地计算结果。备有不锈钢柱，柱温采用电加热，可用直接读数的控制器选定三个温度。自动进样器是一种带有机内冷却式的，它可容纳72个样品，并具有一个优先进样位置，以便需要紧急分析样品进行优先分析，备有样品囊，可装入5—160微升的样品，并编有号码。茚三酮试剂放置冰箱内，茚三酮试剂和缓冲液瓶内充氮气。双光束光度计440纳米，570纳米波长可分别记录或相加，备有荧光检测器。设有安全保护装置，当仪器突然停止工作，状态数字显示出事故的原因。双缸高压柱塞泵，流量13.5毫升/时和135毫升/时之间连续可调。反应温度采用固体加热系统可达130℃。提供"Ultropac 8"阳离子交换树脂，粒度8.0微米。茚三酮检测20pmol氨基酸，荧光检测2pmol氨基酸。蛋白质水解物65分钟，生理体液3小时，完成全分析。

4．联邦德国BIOTRONIK LC5001　带微处理器的全自动。生理体液分析2小时，蛋白质水解液55分钟。茚三酮检测50pmol，荧光检测10 pmol。色谱柱是玻璃柱。固体加热系统，茚三酮试剂、缓冲液和样品放置冷却槽内，这样可长期保存试剂，使用寿命长，保证好的基线，游离氨基酸样品在低温下，不致氧化。备有预柱，柱内填充对氨有高亲和力的树脂，缓冲液通过此柱，氨被吸附，最后氨在再生过程中洗脱下来，使基线平稳。样品自动进样器可放100个样品，每次进样后样品定量管用有机溶剂与水混合液清洗，并用空气干燥。用玻璃柱可以很清楚地看见树脂填充好坏，但不能耐高压。反应盘管可自动清洗以免茚三酮试剂沉积在管内，使管破裂。

5．美国*Beckman* AAA 6300氨基酸分析仪　全自动带有微处理器，操作简单。自动进样，每次可处理48个样品，试剂及样品放置在冷却器内。蛋白质水解样品0.5小时，生理体液2小时可完成全分析。柱及反应管由固体加热系统控制。进样量20 pmol。

（三）氨基酸分析仪进展

现代氨基酸分析仪从以下几个方面进行改进：

1．树脂粒度减小　粒度大小直接与分离效果有关。粒度：200微米→25微米→

18 微米→10 微米→8 微米→6 微米→5 微米→3 微米。

2. 色谱柱内径缩小 使仪器体积减小。

内径：18 毫米→9 毫米→8 毫米→7 毫米→6 毫米→4.6 毫米→3 毫米→2.8 毫米→2.6 毫米→1.75 毫米。

3. 高压泵 最初的仪器用低压泵，压力为几千克/厘米^2。现在为 200 千克/厘米^{2}左右。

4. 反应温度提高 过去用水浴加热，温度为 98℃。现在发展电加热 130℃左右。反应时间缩短。

5. 自动进样 样品用量减少。过去几毫升，现在可用 1—100 微升。对于难得到纯品的生物样品是十分有利的。

6. 试剂耗量减少 因分析时间大大缩短，使试剂用量（茚三酮）由 70 毫升/时到 3.5 毫升/时，大大地降低成本费。

7. 分析一个样品时间短 因树脂粒度减小，泵压力大，使分析时间大大缩短。原来 24 小时 1 个样品，现在只需 0.5 小时，大大提高效率。

8. 采用程序控制及微处理器系统 使仪器全自动化，夜间无人管理工作，仪器出现故障可自动停机。

（四）氨基酸分析仪的应用

氨基酸分析仪应用范围很广，工、农、医、生物、地质等领域都用作为分析手段。

1. 蛋白质化学 蛋白质结构测定，酶反应机理研究，分子进化研究。

2. 医药 代谢失调及控制，细胞生理研究，药物测定。

3. 营养学 食品组成。人体需要从食物摄取蛋白质，其中有 8 种是人体必需的氨基酸，必须从食物中摄取。

4. 其他 考古研究，地质年代研究。

目前，我国氨基酸分析仪用在农业、水产、食品方面约占总用量的 57%，药品及机理研究占 14%，医院 11%，其余用在其他领域如生化、生物学、兽医等。

三、氨基酸分析仪器技术

氨基酸分析仪是大型全自动化的精密的分析仪器。为了测定准确、可靠、使用寿命长，就要注意正确的安装、使用、保养、维护。

（一）仪器安装及验收

1. 选择合适的地点、对温度、湿度的要求 因环境温度、湿度变化对仪器性能有影响。所以安装仪器的房间，最好安装上空调设备，使室温保持在 25±5℃。仪器不要被阳光直射，仪器背面板与墙之间留有一定空间，便于维修。

2. 防震、防尘、防腐和防电磁干扰 仪器部件经不起震动，应安放在离震动源远点的地方。因仪器部件带有光学元件及计算机，所以防尘是十分重要的。安放仪器房间尽量避免腐蚀性气体，样品处理应在另一房间进行。仪器应安放在远离强电磁场的地方，专

有电子稳压器供电，确保电压稳定。

3. 开箱和清点 首先查检包装件是否有损伤，仔细打开各个包装，按合同单和装箱单清点各部件，如有漏缺，在规定日期内与厂商联系。

4. 安装 仔细反复阅读说明书。按照说明书的安装要求，连接电缆、检查电压、连接各部件，安装完毕后，仔细对照说明书检查一遍，确保正确，方能通电。

（二）仪器的维护和保养

氨基酸分析仪的日常维护和保养是保持仪器性能的一个重要方面，是延长仪器使用寿命的不可少的手段，可避免发生大的故障。

仪器分两大部分：流路系统，电路系统。保养应注意下列几点：1)流路系统各接头易沉淀试剂，应定期清洗。2)新配缓冲液或茚三酮试剂，分别打开泵的漏液阀，使旧液流出新液代替。3)每次分析结束前，应让缓冲液冲洗管道一段时间，以免道管堵塞。4)开机前应检查恒温水浴，反应水浴的水位。5)长期不开机，应定期开机，让各部件运转，防止管道堵塞、树脂发霉，电子元件、光学元件受潮。6)分析过程中突然断电，复电后一定要冲洗管道，避免管道沉积结晶而堵塞。7)计算机部分要经常保持清洁，延长使用寿命。

（三）氨基酸分析仪验收指标

各种型号氨基酸的质量鉴定，一般用下列指标检验仪器性能。

1. 分辨率 一般以 Thr-Ser、Gly-Ala 分离情况来判断。835 型指标：

Thr-Ser＞70%

Gly-Ala＞80%

2. 重现性

(1) 峰位置重现性：定性分析要求仪器性能稳定，组分出峰的时间稳定。连续分析10个标准样品，从中选一个峰，求其在图纸上峰位置(出峰保留时间)的偏差值 (CV)。

835型 CV＜±1%

(2) 峰面积重现性：定量分析要求仪器多次测定同一组分，其峰面积相同。连续分析10个标准样品，从 Gly、HiS 中选一个峰，求其图纸上峰面积的偏差值 (CV)。

835 型 CV＜±2.5%

3. 灵敏度

835 型：30Pico Mol (对于 ASP 而言在 100mV,S/N = 3 情况下)。

4. 基线稳定性 835 型：漂移＜2格/天，噪音＜0.5格，温度漂移＜3 格/10℃。

第五章　蛋白质序列仪

杨　端

一、前　言

蛋白质序列仪可以测定蛋白质一级结构或测出部分结构，为DNA序列分析找出探针顺序。还可用于鉴定蛋白质纯度、鉴定人工合成或基因工程表达的活性肽产物、研究蛋白质结构与功能的关系、测定蛋白质或多肽的活性片断、以确定底物与酶的结合位点及催化位点。此外虽然DNA顺序测定可以反推出蛋白质一级结构，但是蛋白质序列分析对确定核酸密码中蛋白质序列的起始点及结束点，以及提供蛋白质乙酰化、糖基化、磷酸化等修饰情况，信号肽或蛋白原的断裂位点，都是必不可少的。对解释蛋白质结晶图谱，分子进化分支点的确定，分子遗传病的机制也很重要。因此，蛋白质序列仪在农业、生物工程、医药学、遗传学及基础科学研究中都是不可缺少的手段。

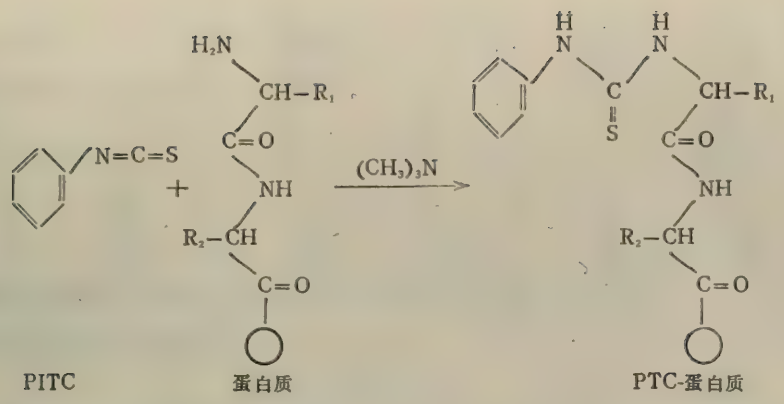
早在1950年，Sanger用2,4-二硝基氟苯法手工测定胰岛素51个氨基酸残基的多肽序列，共用了十年时间，消耗了100克样品。同年Pehr Edman发表了用Edman降解法测定肽中氨基酸序列的论文[1]。根据这个方法的原理，1967年他和Begg设计了第一台自动测定蛋白质序列的仪器[2]，从此开始了用自动化仪器分析蛋白质序列的新纪元。1970年测定一个蛋白质样品约需一年时间，消耗约1克样品，1980年测定蛋白质序列只需1毫克样品，约用一周时间，到1985年已有近两千多个蛋白质测出序列，这是与应用蛋白质序列仪分不开的。

二、简单原理

蛋白质序列仪是利用埃德曼（Edman）降解法，将氨基酸从蛋白质的氨基末端（N末端）逐个降解下来，并将其转化为性能较为稳定的PTH氨基酸，其主要反应可分为3个步骤。

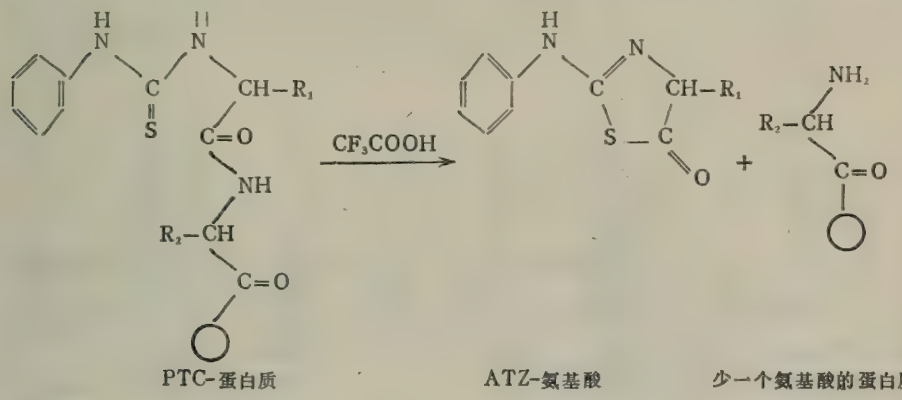
（一）偶联

蛋白质或多肽分子在三甲胺碱性条件下与异硫氰酸苯酯（PITC）反应，生成苯乙内酰硫脲蛋白质（PTC蛋白质），反应如下：



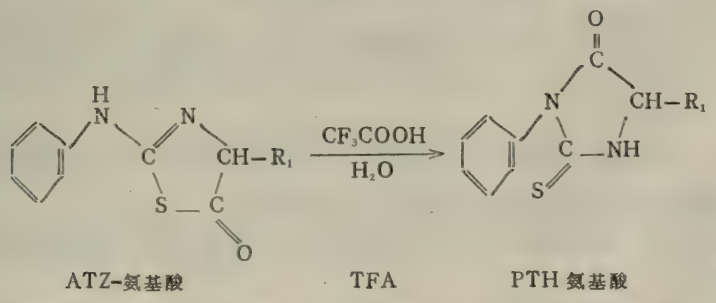
（二）断裂

PTC 蛋白质经三氟乙酸作用，断下一个苯胺基噻唑啉酮氨基酸（ATZ-氨基酸），反应如下：



（三）转化

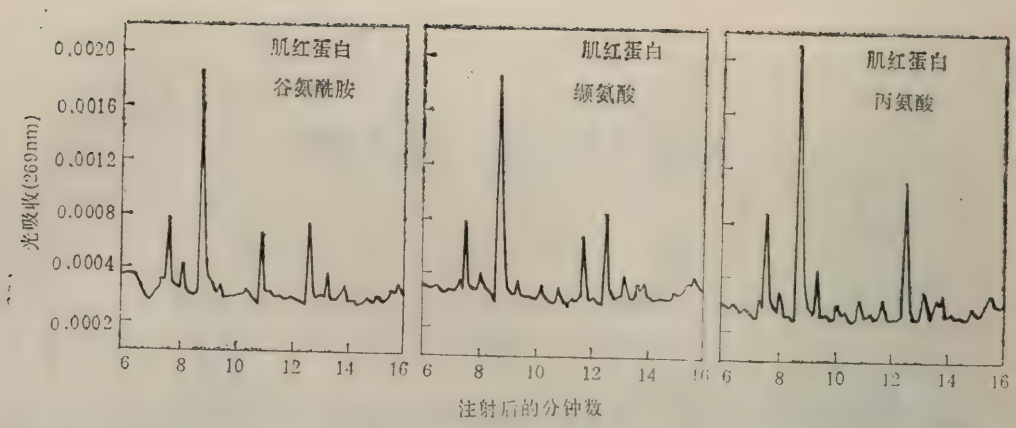
ATZ 氨基酸十分不稳定，在三氟乙酸水溶液中转化成为较为稳定的 PTH 氨基酸，反应如下：



第二步与第三步反应不能合并，因为三氟乙酸水溶液会使肽键分解。

PTH 氨基酸经薄层层析或高效液相层析鉴定，少一个氨基酸的蛋白质又经 Edman 降解断下。由此可以从蛋白质的氨基末端分析氨基酸在蛋白质中的排列顺序。

用 20 pmol 鲸肌红蛋白，经气相蛋白质序列仪和 120A PTH 氨基酸分析仪所得的第 6、13、22个氨基酸高效液相图谱如图 5-1，标准 PTH 氨基酸图谱如图 5-2。



第6,13,22个氨基酸实际高压液相层析谱分析样品为20pmol。资料显示470A型蛋白质序列仪的灵敏度与低干扰。

图 5-1 标准 PTH 氨基酸层析图谱

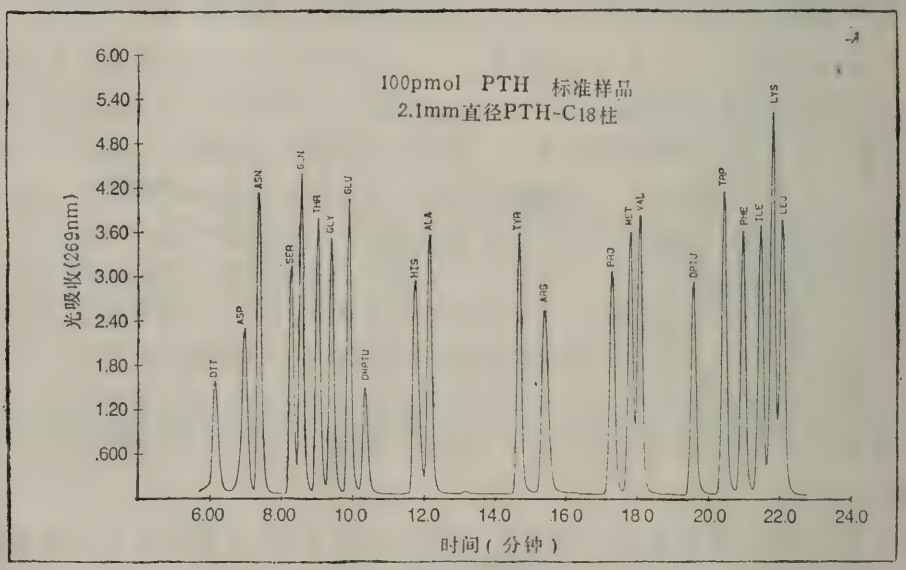


图 5-2 标准 PTH 氨基酸层析图谱

在形成 PTH-氨基酸时，有时某个氨基酸残基会产生一个以上的洗脱峰。其原因是天门冬酰胺或谷氨酰胺在反应时常常会有 10% 的氨基酸残基脱氨，生成相应的 PTH 天门冬氨酸和 PTH 谷氨酸。

谷氨酸在用三氟乙酸、水系统转化时有另一未知副产物洗脱峰在苯丙氨酸旁边天门冬氨酸用上述系统转化时在缬氨酸后也有另一洗脱峰。

丝氨酸与还原剂二硫苏糖醇（DTT）反应后产生 DTT-PTH-丝氨酸，在丙氨酸附近有另一个洗脱峰。

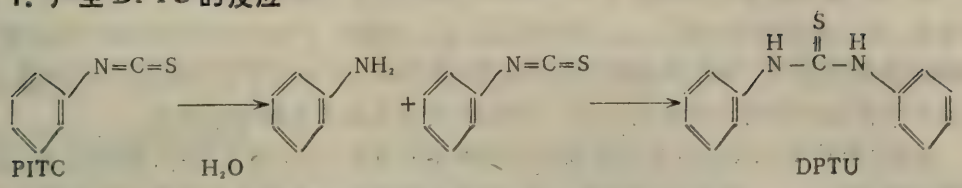
苏氨酸与 DTT 产生多个 PTH-苏氨酸衍生物，出现在 PTH-酪氨酸峰的前后共约 5 个小峰。

半胱氨酸需经羧甲基化或其他方法修饰后才会有洗脱峰。若未经修饰则测不出相应的 PTH 氨基酸，假如氨基酸残基被糖基化也常测不出其组成的峰。

从层析图谱中还可以看到一些非 PTH 氨基酸的吸收峰，它们是 Edman 降解的副反

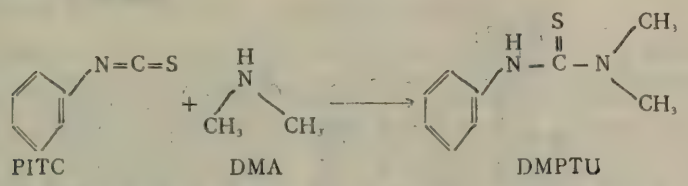
应产物：DPTU、DMPTU、DPU。产生它们的反应如下：

1. 产生 DPTU 的反应



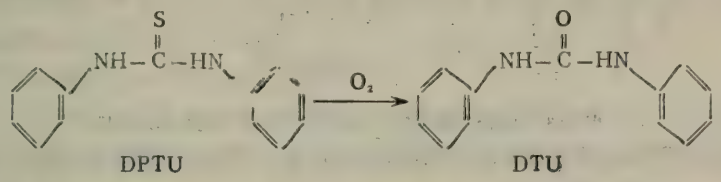
当试剂中含有水分或输送氩气中含有水份，就会使 DPTU 升高。

2. 产生 DMPTU 的反应



当三甲胺试剂放置时间过长，就会产生二甲胺，使 DMPTU 产量升高。

3 DPU 的产生



当氩气中含有氧或漏气，都会使 DPU 副产物增高。

在气相蛋白质序列仪中可以由异常的副产物来判断仪器是否运转正常。

若 DPTU 异常高，其原因可能是：1) *R* 贮液瓶不干燥。2)没有很好的冲洗管道。3)输送阀门泄漏。4) 管道连接不好使水气进入。5) 反应室封闭圈不好或没有压紧使反应室漏或有死体积。6) S_1 和 S_2 溶剂没有很好的洗去 PITC 及副产物。7) 更换氩气后没有清除管道中空气的水分。

DMPTU 升高的原因是：1) R_2 放置时间过长分解。2)输送阀门堵塞。

DPU 过高其原因可能是：1)反应器漏气。2)密封圈不好或压的不够紧密。3) R_1 反应瓶污染。4) R_1 供应过量。5)换氩气后没有冲洗管道。

三、仪器种类及简单结构

蛋白质序列仪可分为液相(旋转杯)蛋白质/多肽序列仪，固相蛋白质/多肽序列仪及气相蛋白质序列仪，脉冲式液相蛋白质序列仪。

(一) 液相(旋转杯)蛋白质/多肽序列仪

根据 Edman 自动旋转杯原理，Beckman 公司从 1969 年即开始生产推销 890 型蛋白质序列仪系列产品，还有日本 Jeol、法国 Socosi 和美国 Illitron 都生产可供商品的序列仪，其中Beckman 890C 型应用最广泛，至今改进成 890M 型微量蛋白质/多肽序列仪。每次测定所需样品，从最初 250nmol，最适肽长度为 25 个氨基酸残基到现在约需 100—200pmol

样品即可测定。

蛋白质或多肽加入旋转杯中，经 Edman 降解，真空干燥除去溶剂后，蛋白质或多肽形成薄膜，贴在旋转杯反应器上，从蛋白质或多肽N末端断下来的 ATZ 氨基酸，则由氯丁烷抽提出来进行分析。每个氨基酸残基分析需 60 分钟，并有微型电子控制器，液相蛋白质/多肽序列仪测定时需大量纯化试剂，一些小肽及疏水肽易从抽提中损失。

液相(旋转杯)蛋白质/多肽序列仪的简单结构见图 5-3，由旋转杯、贮液瓶、阀门、泵、收集器等组成。

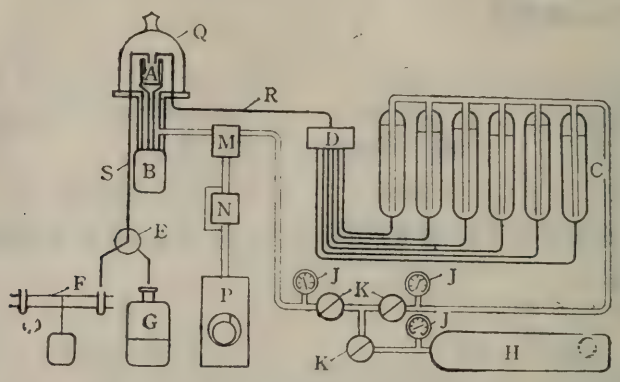


图 5-3　液相（旋转杯）蛋白质/多肽序列仪简单结构图

A 旋转杯，B 马达，C 贮液瓶，D、M、N 阀门，E 出口，F 部分收集器，P 泵，Q 钟罩罐。

（二）固相蛋白质/多肽序列仪

1971年 Laursen 首先设计了固相蛋白质序列仪，由英国 LKB 公司生产的 4020 型蛋白质序列仪，美国 SEQUEMAT 10 和 12 型，法国 SOCOSI PS300 型都属于这一类型，它主要特点是应用聚乙烯等固相支持物将所需测定的少于 30 个氨基酸的多肽的羧基端偶联在层析柱上，然后再进行 Edman 降解反应。这个仪器可以不需要十分纯的试剂，并且可以防止小肽被有机溶剂冲洗掉。但是蛋白质中的谷氨酸因 γ-羧基结合在树脂上，使之无法

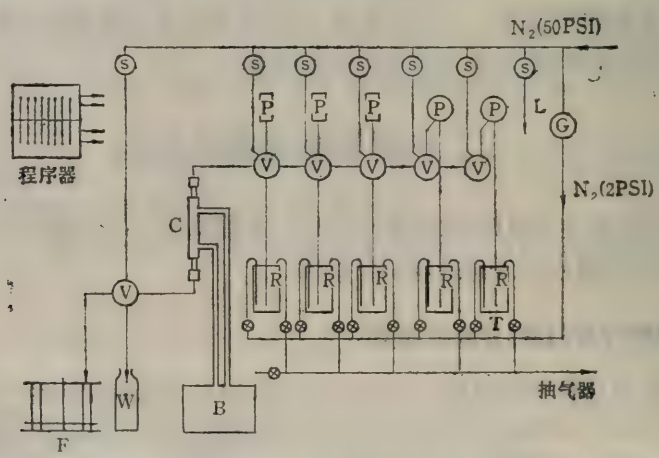


图 5-4　固相蛋白质/多肽序列仪简单结构

B 水浴，C 固相柱　F 部分收集器，G 气瓶，P 泵，R 贮气瓶，V、S、阀门。

测出，天门冬氨酸也会妨碍进一步降解反应，而且操作比较麻烦，蛋白质样品需要量也较大，每次需要 100 纳克蛋白质样品，最适肽长度为 10—15 个氨基酸残基。检定 PTH-氨基酸的方法是薄层层析。

仪器的简单结构见图 5-4。由柱、气瓶、部分收集器、泵、贮液瓶、阀门等部分组成。

（三）气相蛋白质序列仪

1978 年 Hunkapiller M.W. 和 Hood L.E.[4]改进了蛋白质序列仪。他们用 Polybrene 作为蛋白质的载体，高效液相层析分析 PTH 氨基酸，在 1980 年，美国应用生物系统公司（Applied Biosystems）推出了 470A 型气相蛋白质序列仪。

蛋白质或多肽放在反应器的滤膜上，反应器由两个光滑玻璃柱空隙组成，体积为 160 微升。蛋白质经 PITC 作用后由纯的气相三氟乙酸降解，切下的氨基酸残基经氯丁烷提取，转移至容积为 1 毫升的转化器中，经三氟乙酸转化成 PTH 氨基酸。PTH 氨基酸被自动输送到 120A 型 PTH 氨基酸分析仪中，用高效液相逆相层析法鉴定，无须手工操作。多余的 PTH 氨基酸分别收集在收集器的离心管中，以备后患。此仪器可以分析 10—100 pmol 蛋白质或多肽样品的氨基酸序列，每步的收率达 92%。若用 1 nmol 以上蛋白质或多肽样品，每步的收率达 94% 以上。

470A 型气相蛋白质序列仪的特点如下：

（1）试剂与溶剂是由氩气推送，有特殊的阀门控制，所以避免了试剂之间的相互污染，同时也减少试剂的消耗，降低了测定成本，所用试剂为液相蛋白质序列仪的10—20%。

（2）反应是在恒温器中进行，保证了最佳反应条件及可重复性。

（3）由电脑控制整个操作，可自动检查每个电子零件、阀门开关、电源、加热装置及部分收集器的性能。由荧光屏显示每一步骤进行的情况。并可贮存 18 种不同化学循环程序，有视觉听觉警号。

（4）部分收集器能依据记忆自动转到适当位置。

（5）有两个氩气瓶，当第一个氩气瓶压力稍微降低时，另外后备氩气瓶自动打开，继续供应氩气。

（6）三甲胺与纯三氟乙酸以气相输送。

（7）PTH 氨基酸可自动输送至 120A 型 PTH 氨基酸分析仪中分析。

（8）反应步骤分别在反应器或转化器中进行。

气相蛋白质序列仪的简单结构见图 5-5，由电脑，反应器，转化器、无间隙阀门、部分收集器、控温器、贮液瓶等部分组成。

（四）脉冲式液相蛋白质/多肽序列仪

1986 年美国应用生物系统公司又推出 477A 型脉冲式液相蛋白质/多肽序列仪。仪器的基本结构特点与 470A 气相蛋白质序列仪相似，分反应器及转化器部分，并由120A 型 PTH 氨基酸分析仪测定蛋白质氨基酸末端，只是增加了以下新的特点：

（1）由液相供应三氟乙酸及三甲胺，使供应试剂量更为精确。

（2）可以改变反应器和转化器温度程序及改变测定蛋白质序列的程序。

（3）临时停电后，可记忆停电前操作程序，以便电源恢复后继续运行。

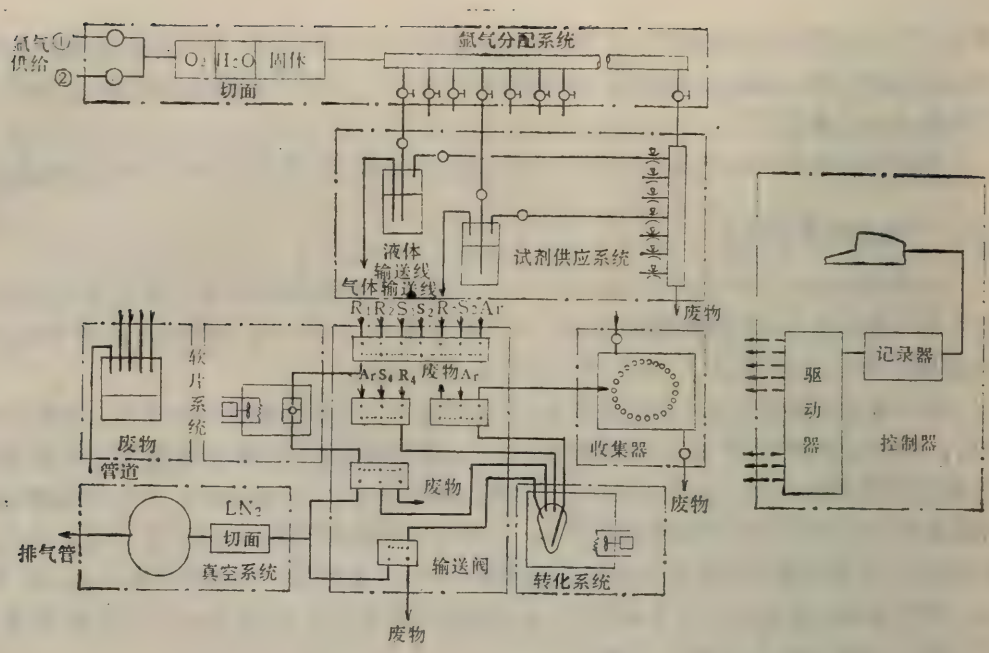


图 5-5 气相蛋白质序列仪简单结构

(4) 自动清洗阀门及管道。

(5) 有电脑数据处理机，可以自动读出蛋白质序列，进行产率计算，并且可以显示层析时间，自动打印层析图谱。

蛋白质序列仪的比较见下表：

蛋白质序列测定方法的比较

测定方法	最适肽大小	样品最低需要量 (nmol)	评论
手工测定	5—10氨基酸	50	设备简单，便宜，需特殊经验
固相序列仪	15	100	需贵重仪器和特殊经验，试剂要求不高
液相序列仪	20—25	100—250	需贵重仪器和大量高质量试剂及特殊经验
气相序列仪	30—50	0.1—1	需贵重仪器和高质量试剂及特殊经验
质谱仪	5—10	100	需贵重仪器和特殊经验
脉冲式液相序列仪	30—50	0.1—1	需贵重仪器和高质量试剂

由上看出手工测序不需要昂贵仪器，可以测定 5—30 个氨基酸残基顺序，由于不能避免氧化脱硫反应使回收率较低。液相(旋转杯)序列仪。最初每次需样品 100—250 nmol，产率可达 96%，现可降至需 100—200 pmol 样品，可测较长的肽，但疏水性小肽容易损失。固相顺序仪，克服了疏水小肽丢失的缺点，所需溶剂质量要求不高，但操作较麻烦，每次需将样品偶联在固相支持物上，产率常常较低，有时只有 20—30%，所以应用不麻烦。气相蛋白质序列仪及脉冲式液相序列仪，所需样品少，回收率高，操作也较简便，所测定氨基酸残基较长，消耗试剂量也较少，可以自动连续测定。脉冲式液相序列仪还可自动读出所分

析的序列，唯一不足是仪器比较昂贵。

四、实验室要求及所需附件

（一）实验室要求

（1）470A 型气相蛋白质序列仪所安放的实验室必须有一个通风柜以排废气。

（2）实验室温度应在 20℃，误差为 ± 3℃。

（3）470A 型气相蛋白质序列仪，宽 47 厘米、高 76 厘米、长 97 厘米、重 175 千克，加上 120A 型 PTH 氨基酸分析仪，宽 53 厘米、长 83 厘米、高 37 厘米、重 59 千克，实验室必须有足够大的实验台放上述仪器。另外，还需有足够的位置放 3—4 个贮气瓶，典型的安排方式如图 5-6 所示。

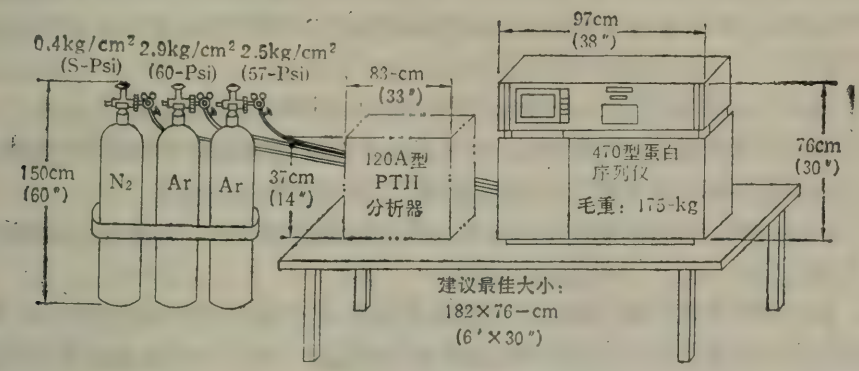


图 5-6　470A型气相蛋白质序列仪

（二）附件要求

购买 470A 型蛋白质序列仪或 477A 型脉冲式液相蛋白质序列仪，还必须配有 120A 型 PTH 氨基酸分析仪及记录器，记录器可以是普通的层析记录器，也可以是 900 型数据处理机。

此外还需两个高纯氩气瓶及 1—2 个高纯氮气瓶，氩气瓶供蛋白质序列仪用，氮气瓶用于清洗管道及用于供 120A 型氨基酸分析仪自动开关注射器用。第一个贮气瓶压力为2.9—4.4 公斤/厘米²，第二个贮气瓶压力应低于第一个贮气瓶，约为 0.22—0.29 公斤／厘米²。

（三）试剂要求

470A 型气相蛋白质序列仪需要试剂如下：

R_1：5%异硫氰酸苯酯正庚烷溶液。R_2：12.5%三甲胺水溶液。R_3：三氟乙酸。R_{4A}：25%三氟乙酸。R_5：乙腈。S_1：正庚烷。S_2：乙酸乙酯。S_3：氯代丁烷。S_{4B}：乙腈。必须是高度纯化的试剂。

除 R_2 必须在 4℃ 保存外，其余试剂和溶剂可保存在 15—20℃ 的暗处。

做 750 次循环 (cycle) 需 S_1 4 瓶，S_2 1 瓶，S_3 3 瓶，S_{4B} 5 瓶，R_1 3 瓶，R_2 5 瓶，R_3 2 瓶，R_{4A} 3 瓶，R_5 3 瓶。

此外还需 Biobrene 一盒用 10 次，反应器密封圈与滤膜，19 种标准 PTH 氨基酸，PTH—C18 层析柱，柱外套、乙腈、5% 四氢呋喃。3 mol/L 乙酸缓冲液 (pH4.6)3 mol/L乙酸缓冲液 (pH3.8)，DMPTU 外标物等试剂。

五、对蛋白质样品的要求

为了能测定蛋白质或多肽的一级结构，必须要求蛋白质或多肽纯度在 95% 以上，无盐。分子量一致。氨基酸组成一致。表现在聚丙烯酰胺 SDS 电泳一条带，HPLC 中均一峰。在提纯过程中，生物活性不再提高。

并且要求蛋白质或多肽只含有一个氨基末端，凡含有多个氨基末端或氨基末端被封闭，都不能直接测定。例如，N-甲酰化，N-乙酰化，焦谷氨酸化，或环形肽。胱氨酸，半胱氨酸，需经修饰后才能测定。蛋白质若用羧甲基化或过甲酸氧化，更有利于测定。

在应用蛋白质序列仪测定以前，最好先作以下实验。

(1) 测定蛋白质的分子量，以确定被测定蛋白质中氨基酸的数目。

(2) 测定氨基酸组成，由蛋白质中氨基酸组成可确定酶解或化学裂解分肽途径，还可确定用蛋白质序列仪的操作程序，以提高形成 PTH 氨基酸的回收率。

(3) 若蛋白质含有二个或多个亚单位，或肽链，则必须分开。在测氨基酸顺序时，每个分开的肽链作为单独一个样品进行测定。

(4) 蛋白质的半胱氨酸之间的二硫键必须还原，游离的硫氢基必须保护，因为他们在反应过程中十分容易再氧化成二硫桥，造成分析的困难。为此二硫键最好用羧甲基化还原或过甲酸氧化有利于序列的测定。

参 考 文 献

〔1〕 P.Edman, Method of the determination of the amino acid sequence in peptides, *Acta chem, Scand*, **4**, 283—293, (1950).

2〕 P.Edman and G.Begg, A.Protein Sequence, *Eur.J.Biochem*, 1, 80—91 (1967).

〕3〕 R.A.Laursen(1971) Solid-phase Edman degratation an automatic peptide Sequencer, *Eur.J.Biochem*,

〔4〕 M.W.Hunkapiller and L.E.Hood, Direct microsequencer analysis of polypeptides, Using an improved sequenator, a non protein Larrier (Polybrene) and high pressure liquid chromatography, *Biochemistry* **17** (11) 2124—2133 (1978).

第六章 电 泳 仪

郭 尧 君

一、电泳技术的历史

电泳是带电粒子在电场中的泳动。它不仅是一种现象，也是一种有效的分离方法和技术。电泳法就是利用各种带电粒子在电场中迁移的差别来进行分离的方法。带电粒子可以是小的离子，也可以是生物大分子，如蛋白质、核酸、病毒颗粒、细胞器、细胞等。它们在电场中迁移的特性取决于粒子的形状和大小，所带电荷的性质和数目，介质的阻力以及电场的强度。

电泳现象虽然早在150多年前就已发现，但它作为一种分离分析方法是1937年瑞典科学家 Tiselius 建立了"移界电泳法 (moving boundary electrophoresis)"后才不断得到发展。Tiselius 对现代电泳技术的创立作出了卓越的贡献。他成功地用"移界电泳法"将血清蛋白质分成5个主要成分，即清蛋白、α_1-、α_2-、β-和γ-球蛋白。他设计的世界上第一台"自由电泳仪"使人们对血清蛋白的了解迈进了一大步。他也因此在1948年荣获诺贝尔奖金。

Tiselius 电泳仪比较昂贵。且由于自由溶液受热后发生密度变化，产生对流，使区带扰乱，分辨率不高。故继蔗糖密度梯度以后，50年代开始寻找合适的电泳支持介质，如滤纸、醋酸纤维素薄膜、淀粉等。特别是60年代后，由于聚丙烯酰胺凝胶具有很高的化学稳定性、低的电内渗和高分辨率，因此被广泛使用。琼脂糖凝胶虽然稍逊于聚丙烯酰胺，但仍然不失为大分子电泳分离的理想支持介质。

现在电泳法已成为生物化学、免疫学、分子生物学实验室以及与这些基础科学密切有关的医学、农、牧、渔业、制药及某些工业分析中必不可少的技术。特别是作为80年代技术革命标志之一的生物工程，有许多环节都离不开各种类型的电泳分离技术。因此，电泳法必然会在基础生物科学的研究中，在国民经济的发展中以及在医疗保健事业中发挥日益重要的作用。

二、电泳分离的原理

在直流电场中，带电荷的粒子向带符号相反的电极移动，称为电泳。早期的电泳是将带电粒子的迁移率作为唯一的分离基础。在电泳过程中，一方面具有不同电泳迁移率的成份逐渐分离。另一方面在迁移过程中由于扩散、区带变宽影响分辨率，加之电流通过介质时产生的热以及支持介质所带电荷引起的电渗现象，更使分辨率下降。为了提高分辨率，主要着眼于消除欧姆热和寻找电渗低的介质，改进加样方法，使起始区带变窄。为了消除热，采用各种冷却的办法，使电泳层尽可能薄。聚丙烯酰胺是理想的低电渗介质。而且凝胶的使用使在电泳过程中引入了一个新的分离因素，即分子筛效应。聚丙烯酰胺凝胶是由化合物的单体聚合而成的。凝胶透明，有一定的机械强度，并可配制成具有不同孔

径大小的各种浓度。凝胶的孔可大到允许分子量为20—30万的蛋白质分子通过。但若凝胶浓度太低，则强度差，不便操作；所以在分离大分子，如巨球蛋白，免疫球蛋白，核酸和病毒颗粒时，就需用孔度更大的琼脂糖凝胶。天然琼脂中含有带硫酸根基团的组分，引起电内渗，所以用于电泳的琼脂糖必须先除去这些基团。琼脂糖特别适合于作免疫电泳的支持介质。

由于聚丙烯酰胺凝胶的迁移率和分子筛的作用，使电泳的分辨率有了明显的提高。为了进一步提高分辨率，人们又改进了各种电泳方法。例如利用在两种不连续缓冲液界面上样品会发生浓缩的原理，建立了盘状电泳方法和仪器。将凝胶制成浓度梯度胶，可以扩大分子筛效应，称为梯度凝胶电泳。在凝胶中添加SDS或其它去污剂，可以使蛋白质解聚，将蛋白质拆分成亚单位，这种电泳方法常用于测定蛋白质分子量。利用凝胶中的pH梯度使各种蛋白质按等电点浓集在各自的等电点处来进行分离的方法，称为等电聚焦电泳。将不同原理的凝胶电泳作二维组合就成为各种形式的双向电泳。如将一样品进行等电聚焦后，再在90°方向进行SDS电泳分离，称为双向电泳。双向电泳的分辨率极高，如果配以高灵敏度的染色方法(银染色法)可分离出1 000个以上的斑点。这一方法对于了解基因表达产物，蛋白酶解图谱等工作提供了有力的分析手段。另外基于抗原的电泳迁移率以及与抗体的专一性免疫沉淀的琼脂糖免疫电泳，可以在临床和研究实验中作为抗原和抗体的免疫学研究的重要手段。

三、各种电泳仪器与用途

电泳仪是生化实验室常用的小型生化分析仪器。种类很多。随着技术的不断发展，电泳仪器的分析对象也越来越专一化。按形式可以分为垂直型和水平型。按分析对象可分为蛋白质分析用、核酸分析用、细胞分析用。按功能可分为制备、分析、转移、浓缩等。

(一) 垂直管型分析盘状电泳仪

尽管由于电泳技术的不断发展，这种电泳仪已趋于被淘汰的趋势。但盘状电泳仪结构简单，操作方便，所以在国内实验室中仍被广泛使用。聚丙烯酰胺凝胶分析盘状电泳法是以Ornstein和Davis的理论和方法为基础的。凝胶在玻璃小管内聚合。样品液放在凝胶柱顶端。系统用不连续缓冲溶液。当电场通过垂直的凝胶柱时，样品成分根据它所带的电荷，分子的大小、形状，以特定的泳动率迁移分离成带(盘状)。

电泳装置由玻管、玻管架、电泳槽、电极和电源组成。

玻管应采用弱碱性的均一圆玻管。内径5—7毫米，外径7—9毫米，管长7—10厘米。管口要磨平。

玻管架与玻管的外径一致。玻管下口插入软橡胶的孔中，或用玻塞外加橡皮管套住，使不渗漏。

电泳槽分为上下两层，各装有电极。下电极槽无特殊要求。上电极槽的底板上，有可垂直插入玻管的小孔。

电极用白金丝最好。形状要适合电泳槽的形状。关键是各凝胶管与电极的距离要相等，以便使各凝胶管的电场强度一致。

电源可采用 600V，100mA 的电源装置。每个凝胶管约需 5mA 的电流强度。如果 10 个管就需 50mA（约 400V 电压）。

国内专门生产电泳仪的北京六一仪器厂就有 DYY-III 27 型圆盘电泳槽和 DYY-III 25、26 型管板两用电泳槽。

（二）垂直板状电泳仪

垂直板状电泳的基本原理和操作方法与垂直管型盘状电泳大同小异。差别只在于不是在玻璃小管中制胶，而是在两块垂直放置的平行玻璃板中制胶。垂直板状与垂直管型相比，其优点在于：表面积大，易于冷却；电泳后易于取出凝胶；可在同一块胶板上同时比较多个样品；可作双向电泳；便于作各种鉴定，如放射自显影。

垂直板状电泳仪常包括以下几个部分：灌胶模具，电泳槽，电源及冷却系统。

垂直板状凝胶模具种类很多，结构大致相同。关键在于使凝胶不渗漏。一般都是用两块平整的厚玻璃板来制作。两玻片之间用隔条隔开。玻璃板大小和隔条厚度可根据需要而定。为防止渗漏，隔条上涂一层真空硅酮油或用 2％洋菜封住。灌胶后，将梳子插入凝胶液顶部，以使聚合后在凝胶顶部形成凹槽。以后样品液就加在这些凹槽中。梳子的深度与宽度应与玻璃板大小相应。如 40 厘米长的玻璃板，梳子应插入 1 厘米深。梳子宽度和凹槽间隔可为 0.5—1 厘米。梳子厚度应与凝胶板的厚度一样。如制备用就不加梳子。

垂直板状电泳仪一般包括上、下各一个缓冲液槽，冷却系统以及电极和安全盖。

下面的缓冲液槽用于盛缓冲液和支撑上面的缓冲液槽以及冷却系统。上面的缓冲液槽用于盛缓冲液并在电泳时用以支撑凝胶。冷却系统（或称热交换器）与外循环水浴相连，用于排除电泳时在凝胶上产生的热。电极由铂金丝制。在安全盖上有两个接头与电泳电源相连。

在 70 年代，垂直板状电泳被广泛用于蛋白质和核酸的分析。现在则有被水平电泳仪替代的趋势。但国外各公司仍保持其代表性产品，如 Pharmacia LKB 公司的 GE-2/4 型，GE-2/4LS 型和 2001 型垂直电泳系统以及 Bio-Rad 公司的 Protean II 垂直电泳系统。国内北京六一仪器厂的 DYY-III 21 型至 26 型以及 28 型均属此电泳系统。

原 LKB 公司的 Midget 是一个小巧、结构紧凑的快速垂直电泳系统。一次可以同时制 10块凝胶。电泳只要 45 分钟便可完成，但并不影响分辨率。凝胶厚度可任选。

（三）水平平板电泳仪

水平平板电泳仪（简称水平电泳仪）给实现多功能化和提高分辨率提供了条件，所以 80年代后越来越显示其威力。水平电泳仪也常常包括灌胶模具、电泳槽、电源及冷却系统。

水平电泳仪常常是多功能电泳装置。在使用不同技术时，要采用不同的凝胶模具。如做薄层等电聚焦凝胶时，常采用毛细管凝胶灌胶模具。在模具台上放一块长玻璃板，然后放上欲制凝胶厚度的隔片。边倒入配置好的凝胶溶液边推进另一块玻璃板。一定时间后，凝胶就在两块玻璃板的隔片中聚合了，如做免疫电泳用的琼脂糖凝胶，只要将琼脂糖溶液倒在水平台的塑料支持膜上便可以了。如做 SDS 凝胶、浓度梯度凝胶，则常将模具直立灌胶。

市售水平电泳槽的形状各异，但结构大致相同。以 pharmacia LKB 的 2117多用电泳仪为例，它是由多用电泳仪基座（包括盛缓冲液的槽）、冷却板、电极、电极架以及安全盖组成的。

水平电泳装置的关键在于冷却板。冷却板的效果好，凝胶可以在冷却板上得到充分的冷却，才可以在凝胶上加高压，才能缩短电泳时间，提高电泳的分辨率。冷却板有两种，一种冷却板做成中空，里面通以冷却水。另一种是采用电子冷却系统。

基座包括盛缓冲液的液槽，以便于进行常规聚丙烯酰胺、琼脂糖、SDS、免疫电泳等。

水平电泳装置的电极由过去的固定型改变成现在的可移动型给操作带来了很多的方便，这样凝胶就可大可小，可长可短。

现在市售的水平电泳仪种类很多。其中以 Pharmacia LKB的2117 型由于其功能多、质量可靠、技术先进、操作方便等原因，在实验室中较为多见。与 2117 型相似的 2217型等电聚焦电泳仪是专门用于等电聚焦电泳的。对碱性蛋白的等电聚焦特别合适。因为该电泳仪可以在密封状态下通氮气进行电泳。同时期的 Pharmacia FBE-3000 型水平电泳仪缺少冷却系统，功能也少于 2117 型。最近，Pharmacia 公司推出的 Phast System 水平电泳系统可谓是新一代仪器，代表了当前电泳仪器的水平。仪器分为两个部分——电泳部分和染色部分。整个过程，从电泳、固定、染色、脱色到保存全部由电脑控制，改变了过去电泳实验长期使用手工操作的状态。所以操作极为简便和省时，而且也具有多功能。但必须使用 Pharmacia 公司的成品胶。

Bio-Red 公司在过去水平电泳系统（Bio-Phoresis）的基础上，最近推出了微型等电聚焦电泳仪——Model III Mini IEF cell。使用方便，但只能做等电聚焦电泳。联邦德国 LRE 公司的各种电泳仪也曾在中国展出过。

北京六一仪器厂也生产多种水平电泳槽，如 DYY——III 21、29、30、31、32、33、34、36、37、38、46 等可供不同种类电泳使用。

（四）用于核酸分析的电泳仪器

Pharmacia LKB 公司生产一整套核酸电泳仪器，从核酸片断分析、序列测定到数据分析。它为基因工程研究提供有力的工具。

Pharmacia LKB公司生产的称为潜水电泳的 Maxiphor 和微型潜水电泳的 Miniphor 是一种桥式水平琼脂糖电泳，用来分离 DNA 和 RNA片断。由于这两种电泳装置可以进行楔形梯度凝胶电泳，所以可获得均匀的片断。电泳槽是用注塑成型法制成，而不是通常的粘接而成，故可确保密闭不漏。装置有整体的冷却套，所以可在高压下进行快速电泳。加样量为 3—300 微升，可用双梳技术一次处理 40 个样品。

Pharmacia 公司相应的仪器有 GNA-100 和 GNA-200 型“潜水电泳”和“微型潜水电泳”。Bio-Red 公司有 Sub-Cell DNA Cell，Wide mini-Subcell 和 Mini-Subcell。

用于核酸序列测定的 Macrophor 是Pharmacia LKB 公司 80 年代的产品，它也包括灌胶装置和电泳槽两部分。灌胶装置能浇注楔形梯度凝胶，可浇注薄至 0.1mm 的凝胶。这个技术对 DNA 和 RNA 的分离很为重要。它可在半米长的凝胶上把多达 300 个碱基对均匀地分离开。凝胶的宽度足以同时处理 36 个样品。电泳槽是垂直板型的，具有旋转安全罩，缓冲液槽的容积可以调节以适应任何长度的凝胶板，并有硅酮橡胶垫密封。由于

电泳装置的恒温板是精心设计的，所以电泳时不会产生边缘效应，这为以后读带时的自动扫描技术创造条件。Bio-Red 公司与此相应的仪器是 Sequi-Gen Nucleic Acid Sequencing System，比较简陋。

脉冲电场凝胶电泳装置是近年来发展的一项新技术。它是脉冲电场和潜水电泳的结合。它使用几套电场，依不同角度于一定时间周期交替作用。当第一电场作用时，使卷曲分子在水平面内拉直并沿凝胶板移动。当第一电场作用停止而第二电场作用时，分子将依第二电场方向移动。DNA 分子的净移动量是分子大小的函数。脉冲技术可用于所有的 DNA 电泳，可以大大提高分辨率。最近，哥伦比亚大学的一位博士报道：大到 9 百万碱基对的 DNA 片断也能得到高分辨率的分离。

1985年 Pharmacia LKB 公司首先向中国推荐了它们的脉冲电泳仪2015型 Pulsaphor。它包括脉冲电泳槽、脉冲控制单元以及电源。

凝胶模具用于灌浇 20×20 厘米凝胶，厚度为 1 厘米。脉冲控制单元用于选择脉冲时间。选择范围从 0.1 到 999.9 秒，间隔 0.1 秒。它有 4 个插口。2 个连接到电源上，另 2 个连接到脉冲电泳槽的盖上。脉冲电泳槽的盖与槽内锁。电泳槽下面的 4 个水平脚可将槽调至水平位置。铂金电极（diode-isolated platinum electrodes）被装在电泳槽的 4 个电源轨条上，以给出精确的电场强度和电极的重复定位。当南-北和东-西的位置被合适的选择，则电极就产生 1 或 2 个不均匀电场。因为电极很容易移动，就可得到很多不同几何形状的电场。这种特性使脉冲电场电泳能得到最佳的分辨率。

（五）电泳转移仪

电泳转移是当前盛行的一种新技术，电泳转移仪也就成为当前热门的仪器。这是利用各种吸附的办法，将 DNA、RNA 或蛋白质凝胶电泳后的区带吸附到硝酸纤维素膜上或其它处理过的膜或纸上。就等于将一次电泳的结果拷贝成几份，再各自进行蛋白质、同功酶染色、放射自显影、免疫检测等，甚至作制备性洗脱。

一般电泳转移仪的装置常常是在一个缓冲液槽中放几个夹子。在夹子中铺以凝胶、膜和滤纸。为了增加转移效率，在夹子的阳极和阴极之间通以较大的电流，以使电泳后凝胶上的区带转移到膜上。

Pharmacia LKB 公司有四种电泳转移仪：一种是如上述结构称为 Transphor System。这种电泳转移系统包括电源和电泳转移槽。第二种是结构与上述相似，但是作为小型快速垂直电泳（Midget）的附件，称为 Multi Blot，它可借用电泳用的电源，所以价格相应比较便宜。第三种是丹麦科学家的发明，称为 Nova Blot。它是作为多用电泳仪（Multiphor）的附件；可借用电泳用的电源。Nova Blot 实际上是两块石墨电极板分别作为阴极和阳极放在多用电泳仪的电泳槽上，中间铺以凝胶、滤纸和膜。这种新的设计不但使转移效率大大提高，而且价格大约只是第一种转移系统的三分之一。第四种电泳转移仪是专门用来转移核酸电泳的凝胶的，称为 VacuGene。它是将凝胶和膜依此放在电泳转移装置中，然后抽真空进行转移的。

Bio-Red 公司有三种电泳转移系统。第一种称为 Trans-Blot cell 加上 200／2.0电源便可进行电泳转移。第二种是新推出的称为 Mini Trans-Blot cell。第三种是 Western Blot System，这是专门用于检测 HTLV Ⅲ/LAV 抗体的。

北京六一仪器厂也有两种电泳转移槽，DYY-III 39 和 40 型。

（六）制备电泳仪

理想的制备电泳仪应具有分辨率高、分离量大、回收率高，并且不改变样品的物理化学性质和生物学性质等特点。利用等电聚焦进行制备的制备电泳仪具有此特点。

70 年代初，原 LKB 公司有一个柱状等电聚焦制备电泳仪，使用蔗糖密度梯度作为支持介质，用载体两性电解质作 pH 梯度。但操作冗长、烦琐，现已被淘汰。代替它是多用电泳仪的制备附件。使用水平平板等电聚焦制备，不但操作大大简化，且制备量可达 2 克。

Bio-Red 在 1987 年推出 Rotofor TM cell 制备等电聚焦电泳仪用于蛋白质的制备和纯化。这个装置主要是一个圆柱形的聚焦腔绕它的轴旋转。在圆柱形聚焦腔中，19 个平行的单丝聚酯膜筛把腔分成 20 个室。蛋白质聚焦后，每个室的溶液很容易被收集。这样在别的装置中可能发生的在收集洗脱液时再混合的问题就可以被克服。在 4 小时的电泳后，蛋白质样品可被纯化 25 倍。

四、电泳仪器的配套装备

（一）电源

要使带有电荷的蛋白质或核酸分子在电泳槽中迁移，必须加电场，而且所加电压越高，电泳的分辨率也就越高，当然所加电场必须稳定，才能得到重复的结果。

电泳用的电源式样很多，性能各异，发展很快。从用手调的电源，发展到恒流、恒压以及恒功率即三恒电源，使电泳时的电参数完全达到自动控制。

不同的电泳技术需要不同的电压、电流和功率，所以选择电源主要根据所用电泳技术的需要。

国内外电源的主要性能见表 6-1 至表 6-3。

表 6-1　Pharmacia LKB公司的电源

型　　号	电压（伏）	电流（毫安）	功率（瓦）	方　　式
2297	5 000	150	200	恒压，恒流，恒功率
ECPS 3000/150	3 000	150	150	恒压，恒流，恒功率
2197	2 500	250	100	恒压，恒流，恒功率
2301	500/1000	400/200	200	恒压，恒流
EPS 500/400	500	400	200	恒压，恒流
GPS 200/400	200	400	40	恒压

表 6-2　Bio-Red公司的电源

型　　号	电压（伏）	电流（毫安）	功率（瓦）	方　　式
3000Xi	3 000	300	400	恒压，恒流，恒功率
500/200	500	200		恒压，恒流
100/200	100	200		恒压
200/2.0	200	2 (A)		恒压
2000/200	2 000	200		恒压

表6-3 北京六一仪器厂的电源

型号	电压（伏）	电流（毫安）	功率（瓦）	方式
DYY-Ⅲ1	150/600	25/100		稳压
DYY-Ⅲ2	150/600	25/100		稳流，稳压
DYY-Ⅲ3	600/1 500	25/100		稳压
DYY-Ⅲ4	600/1 500	25/100		稳压，稳流
DYY-Ⅲ5	150/600	40/200		稳压，稳流
DYY-Ⅲ6	250/500	50/1 000		
DYY-Ⅲ7	250	50/1 000		
DYY-Ⅲ8	150/600	25/100		稳压，稳流

（二）循环恒温水浴

提高电泳分辨率的措施之一是加大凝胶上的电场强度。由此在电泳过程中凝胶上会产生过量的热，甚至导致烧胶。所以温度就成了加大电场强度的限制因子，也就成了分辨率的限制因子。故电泳槽中常设有冷却管和冷却板与循环恒温水浴相连。Pharmacia LKB公司的2219型多点循环恒温水浴温度范围在－10—90℃，流量5—10升/分。足以使凝胶冷却，可用于各种电泳仪。该公司的另一个多点循环恒温水浴，其温度范围为45—90℃，可用于DNA/RNA序列分析电泳仪。Bio-Red公司用于电泳的循环水浴是4860型，其温度范围为－10℃至60℃，流量7.5升/分。

（三）凝胶干燥器

凝胶干燥器用于将电泳后的凝胶干燥保存，以便保存结果备查。特别是对于厚度在1毫米以上的凝胶使用甘油脱水后自然保存日后容易龟裂，最好使用凝胶干燥器。但是近年来发展的薄层和超薄层凝胶，只需要用甘油脱水后，自然干燥保存。不需要用凝胶干燥器。

Pharmacia LKB公司的2003型和GDS-4型与Bio-Red公司的443和483型均可供选用。

（四）透照仪

为了清晰的观察凝胶上的区带，可使用透照仪。如Pharmacia LKB公司的2011型Macro Vue透照仪对用溴乙锭染色的DNA，RNA凝胶的观察特别有用。它是用一个高强度的302nm的光照射凝胶，以观察凝胶上的荧光带。对单个DNA带，检测灵敏度可达1纳克。

（五）电泳浓缩器

从凝胶板上洗脱核酸所用的大多数生物化学技术都非常麻烦和费时，而且回收率低。Pharmacia LKB公司近几年推出一种电泳浓缩器称Extrophor。它可以同时处理多达6个DNA或RNA样品，回收率可达95%。小量样品的洗脱时间约为20分钟。大量样品为120分钟。这种装置也可以把蛋白质从SDS凝胶中分离出来。

（六）光密度扫描仪

光密度扫描仪主要用来对样品层析和电泳后分离的区带或斑点进行扫描，从而给出定量的结果。光密度计的设计原理和结构与分光光度计基本一致。只是光密度计测量的是层析板，凝胶板或凝胶条。有的分光光度计带有光密度扫描附件，也可以用来扫描电泳谱和层析谱。

光密度计的结构与常规分光光度计一样也分为光源、单色器、样品室、光电倍增管以及线路控制部分（参见本书第一册《光谱仪器》中第一章"紫外-可见分光光度计"）。所不同的只是光密度计样品室的设计是专门用来放置层析板、凝胶板或凝胶条的。样品台常常由马达控制，并以不同速度移动，使欲扫描的区带或斑点移入光路。如岛津公司的薄层扫描仪和 Pharmacia LKB公司的光密度计属此类。

有的光密度计用汞灯作光源，配以滤光片来选择波长，如果带有紫外辐射的汞灯可以扫描不染色的凝胶。如果只有可见辐射的汞灯，则必须染色。大部分光密度计用钨灯或碘钨灯作光源，配以滤光片或光栅单色器来选择波长，此时凝胶也必须染色。如果用带有氘灯的光密度计扫描，凝胶才可以不染色。

有的光密度计主要用于薄板层析扫描，如岛津 CS 系列薄板层析扫描仪，它可以作透射、反射、荧光几种方式测定，但分辨率不高。Pharmacia LKB 公司的激光光密度计只能作透射扫描，但因用激光作光源，仪器分辨率很高，线性范围也很大，适于作凝胶电泳扫描。

表 6-4 将一些光密度计的特性作一简单的比较。

表 6-4　一些光密度扫描仪的特性

公　司	型　号	光　源	单色器	测光方式	分辨率	测量范围	线性	与计算机连用功能
Pharmacia LKB	2222	激光光源		透射	优于55微米	0—4 Å	0—4	1D,2D
Hirschmann	Elscript2 Elscript3	钨灯	滤光片	透射		0—2.5 Å	优于0.5%	
Bio-Red	620	荧光灯	滤光片	透射,反射	330(160)微米	0—3 Å		1D,2D
LRE	Pherotron	卤素灯	滤光片	透射，反射		0—3.5Å		
Shimadzu	CS—9 000	氘灯 碘钨灯	光栅	透射，反射，荧光	0.05毫米	0—4 Å		1D,2D

在当代计算机技术普遍应用的年代里，各种光密度计均为微机控制，且可与计算机联用，使光密度计具有更多的功能。如与计算机联用后，使用特定的软件，才能测定大分子的等电点，分子量以及进行双向图谱的分析和核酸碱基排列的分析等。

五、应　用

电泳早已是生化实验室进行生物大分子分离分析的重要手段。随着电泳技术的不断发展，它已被广泛应用于农、林、牧、副、渔、医以及生化基础理论研究中。

等电聚焦电泳是根据蛋白质分子的等电点来进行分离的，具有很高的分辨率。因此

使用等电聚焦技术可以分辨蛋白质以至只有微小差别的不同种的蛋白质和同功酶等。为此在医学上可以用来诊断疾病，如利用血红蛋白 AIC 电泳带的含量来诊断糖尿病。利用乳酸脱氢酶同功酶的变化来作癌的早期诊断。在法医学上可以利用葡萄糖磷酸变位酶，酸性磷酸酶同功酶等来鉴别分型。在食品分析中，可以利用食品的蛋白谱或酶谱的差别来鉴定分析并确定其新鲜程度。在农业上可以借助于等电聚焦带来进行品种鉴定，并为定向培育优良品种提供依据。

SDS 电泳主要用来测定蛋白质分子的亚基分子量。为制备的样品提供生化参数。这是生化研究中不可缺少的数据。根据分子量的不同也可以用来诊断疾病，如某种肾脏疾病就可以利用这种技术来诊断。

双向电泳由于它的高分辨的优点可以用来解决医学上的一些疑难病症以及探求发病机制等。

免疫电泳在农、林、牧、副、渔、医的生产实践中已有广泛的应用。如用火箭电泳来诊断肝癌。用免疫电泳来鉴定一些生物制品的纯度。在农业上用免疫电泳鉴别杂交优势等等。

核酸电泳在遗传工程研究中占有重要的地位。利用各种核酸电泳仪，可以分离分析核酸大分子、核酸片断以及核酸分子中的碱基排列，从而可以对医学上和农业上的一些课题如分子病的探讨，基因重组的实践应用等作出贡献。

中科院植物所图书馆
S0011867

编到期 90.3.17
来源 西单书
书价 6.20
单据号 147619
开票日期 90.3.16.

25303

58.173
428

生物化学仪器指南
第二册 色谱仪器 1989

借者	还期	借者	还期
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

58.173
428
注 意

1 借书到期请即送还。
2 请勿在书上批改圈点，折角。
3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

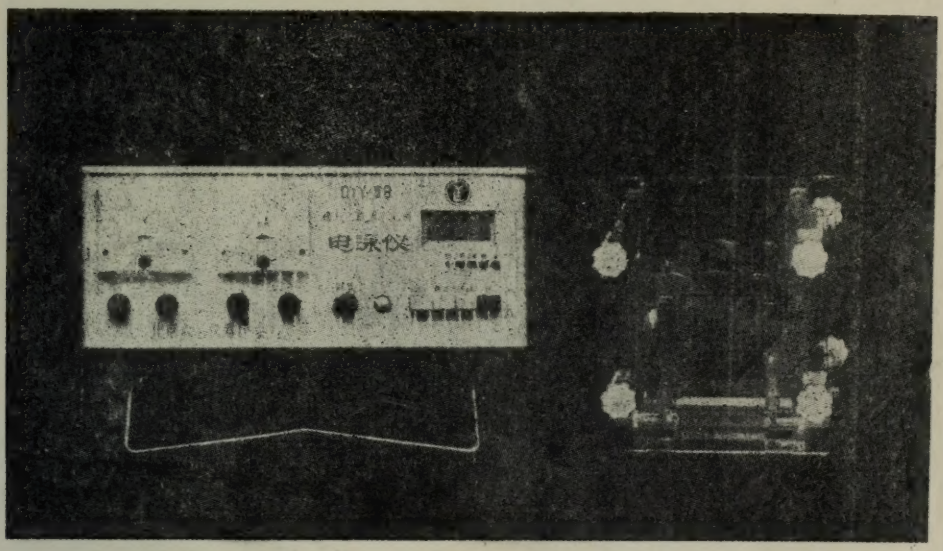
25303

京卡 0701

DYY—III系列

电 泳 装 置

随着生物技术的迅速发展，电泳手段正在许多领域普及，由此对电泳装置的要求也越来越高、希望多型号、高精度。为了适应这一需要，六一仪器厂设计生产了DYY—III系列电泳装置，包括各种规格型号的电泳仪、电泳槽和配套附件。



电泳仪

电压范围：0—250V,0—600V,0—1500V

电流范围：0—100mA，0—400mA，0—1000mA

电泳槽

全部配铂金电极

分垂直平板、卧式平板槽、圆盘槽、电转移、等电聚焦槽等。

●用途广泛

DYY·III系列电泳装置可作各种纸电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳、淀粉凝胶电泳、梯度凝胶电泳、等电聚焦电泳、双向电泳、放射自显影电泳、转移电泳、酶标电泳、免疫电泳及制备电泳等。

北京六一仪器厂

厂　　址：中国北京阜成门外定慧寺　　邮政编码：100036

开户银行：工商银行北京翠微路分理处　　帐　　号：046103—34

电　　挂：0390　　电　　话：810390

生物化学仪器指南

郭尧君　徐　浩　主编

第一册	光谱仪器	郭尧君　主编
第二册	色谱仪器	郭尧君　主编
第三册	波谱仪器、离心机、X射线衍射仪等	郭尧君　主编
第四册	显微镜、电子显微镜及其附属设备	姚骏恩　主编

ISBN 7-03-001 6[illegible]-7
Q·1[illegible]
定　价：[illegible].20元
科技新书目：205-089[illegible]